DISORBIMYCIN
EIN NEUES ENGSPEKTRUM-ANTIBIOTICUM AUS PENICILLIUM CHRYSOGENUM

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MONIKA KNEER
geb. Transier
aus Stuttgart

1980

80 510

DISORBIMYCIN
EIN NEUES ENGSPEKTRUM-ANTIBIOTICUM AUS PENICILLIUM CHRYSOGENUM

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MONIKA KNEER
geb. Transier
aus Stuttgart

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 1980
Dekan: Professor Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Reinhard

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0067

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Anregungen und die großzügige Unterstützung danke ich Herrn Professor Dr. H. Zähner.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. A. Zeeck und Herrn H. Eiffert, Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, für ihre Arbeiten zur Strukturaufklärung des Antibioticums Disorbimycin.

Frau Dr. H. Drautz und Herrn Dr. K. Heller möchte ich für die zahlreichen anregenden Diskussionen danken.

Herrn K. Wusch danke ich für das Zeichnen der Abbildungen.

Allen Mitarbeitern der Lehrbereiche I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Im Text verwendete Abkürzungen:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
CBS	Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
cpm	Impulse pro Minute
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen Berlin, Göttingen
E_{578}	Extinktion bei 578 nm und 1 cm Schichtdicke
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
ETH	Stammsammlung des Instituts für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz
IR	infrarot
MHK	minimale Hemmkonzentration
NCTC	National Collection of Type Cultures, London, Großbritannien
Poly(Phe)	Phenylalanin Polypeptid
Poly(U)	Polyuridylsäure
PPO	2,5 Diphenyloxazol
S100	Überstand nach Zentrifugation bei 10^5 g
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tü	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Tübingen
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Verhältnis von Volumenteilen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Chemikalien	3
2.1.1.	Chemikalien für Nährmedien	3
2.1.2.	Chemikalien für Fermentation und Aufarbeitung	3
2.1.3.	Chemikalien für Antagonistenversuche	4
2.1.4.	Radiochemikalien	4
2.1.5.	Chemikalien für Enzymversuche in vitro	5
2.1.6.	Antibiotica zu Vergleichszwecken	5
2.2.	Nährmedien	6
2.2.1.	Nährmedien für den Produzentenstamm	6
2.2.1.1.	Medium zur Produktion von Disorbimycin	6
2.2.1.2.	Medium zur Anzucht von Impfkulturen	6
2.2.2.	Nährmedien zur Anzucht der Testkeime	7
2.2.3.	Nährmedium für NS-1 Tumorzellen	9
2.3.	Versuchsorganismen	10
2.3.1.	Bakterien	10
2.3.2.	Pilze	11
2.4.	Methoden zur Herstellung von Disorbimycin	12
2.4.1.	Fermentation des Antibioticums	12
2.4.1.1.	Kulturen im Erlenmeyerkolben	12
2.4.1.2.	10 l Fermenter	12
2.4.1.3.	25 l Fermenter	12
2.4.1.4.	20 und 200 l Fermenter	13
2.4.2.	Fermentationsanalyse	13
2.4.2.1.	pH-Messung	13
2.4.2.2.	Sedimentbestimmung	13
2.4.2.3.	Glucosebestimmung	14
2.4.2.4.	Lactosebestimmung	14
2.4.2.5.	Disorbimycinkonzentration	14

		Seite
2.4.3.	Isolierung des Antibioticums	14
2.4.3.1.	Erste Anreicherung	14
2.4.3.2.	Weitere Reinigungsschritte	15
2.5.	Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung des Antibioticums	16
2.5.1.	Dünnschichtchromatographie	16
2.5.2.	Spektren	16
2.6.	Methoden zur biologischen Charakterisierung des Antibioticums	16
2.6.1.	Plattendiffusionstest	16
2.6.1.1.	Testplatten mit Bacillus brevis und Bacillus subtilis	16
2.6.1.2.	Testplatten zum Wirkungsspektrum	17
2.6.2.	Kreuztest	17
2.6.3.	Verdünnungsreihentest	17
2.6.4.	Bioautographie	18
2.6.5.	Penicillinase-Test	18
2.6.6.	Biophotometerversuche	18
2.7.	Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise	19
2.7.1.	Herstellung von Escherichia coli-Protoplasten	19
2.7.2.	Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil und Isoleucin	19
2.7.3.	RNA-Synthese in vitro	21
2.7.4.	Interaktionen mit DNA	21
2.7.5.	Zellfreie Proteinsynthese	22
2.7.6.	Beladung der t-RNA in vitro	23
2.7.7.	Messung an Lipidvesikeln	24
2.7.8.	Test auf toxische Wirkung	24
2.7.8.1.	Test an NS-1 Tumorzellen	24
2.7.8.2.	Test auf höhere Organismen	25
3.	ERGEBNISSE	26
3.1.	Bestimmung des Produzentenstammes	26
3.2.	Herstellung von Disorbimycin	26
3.2.1.	Optimierung	26

Seite

3.2.2. Fermentation des Antibioticums 27
3.2.3. Isolierung des Antibioticums 32
3.3. Physikalische Charakterisierung 34
3.3.1. Löslichkeit 34
3.4. Chemische Charakterisierung 34
3.4.1. Dünnschichtchromatographie und Identifizierung 35
3.4.2. Spektren 36
3.4.2.1. UV-Spektrum 36
3.4.2.2. IR-Spektren 39
3.4.2.3. ^{13}C-NMR-Spektren 43
3.4.3. Vorläufige Daten von Disorbimycin und Sorbimycin 43
3.5. Biologische Charakterisierung 45
3.5.1. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Disorbimycinkonzentration 45
3.5.2. Wirkungsspektrum 46
3.5.3. Wachstumskurven unter dem Einfluß von Disorbimycin 50
3.6. Versuche zur Wirkungsweise von Disorbimycin 54
3.6.1. Antagonisten von Disorbimycin im Kreuztest 54
3.6.2. Wirkung von Disorbimycin auf Escherichia coli-Protoplasten 55
3.6.3. DNA-, RNA- und Proteinsynthese in vivo 56
3.6.4. Wirkung von Disorbimycin auf die RNA-Synthese in vitro 60
3.6.5. Interaktionen mit DNA 61
3.6.6. RNA-Synthese unter Einfluß von Chloramphenicol und Disorbimycin in vivo 61
3.6.7. RNA-Synthese in Bacillus subtilis BR 16 RC^{str} und Bacillus subtilis BR 16 RC^{rel} unter Einfluß von Disorbimycin 63
3.6.8. Einfluß von Disorbimycin auf die Proteinsynthese in vitro 65
3.6.9. Beladung der t-RNA in vitro 66
3.6.10. Messung an künstlichen Membranen - Liposomenversuche 67

Seite

3.6.11. Test auf Toxizität bei NS-1 Tumorzellen 67

3.6.12. Test auf Toxizität bei höheren Organismen 67

4. DISKUSSION 68

4.1. Fermentation 68

4.2. Gegenüberstellung von Disorbimycin und Sorbimycin mit Sorbicillin 69

4.3. Überlegungen zum Wirkort 71

5. ZUSAMMENFASSUNG 74

6. LITERATURVERZEICHNIS 76

1. EINLEITUNG

Die "Penicillin-Sage" kann nach Sheehan (1980) grob in drei Perioden unterteilt werden.

Die erste begann mit Fleming's Beobachtung einer Antibiose zwischen Penicillium notatum und einem Staphylococcus-Stamm im Jahre 1929, einem Jahr, das wohl als der eigentliche Beginn der Antibiotica-Forschung angesehen werden kann.

In den späten 40er Jahren bis 1959 gelang Sheehan die chemische Synthese von Penicillin V und von 6-Aminopenicillansäure sowie deren Acylierung. Hierdurch war die Möglichkeit zur Synthese einer großen Anzahl von verschiedenen Penicillinderivaten geschaffen.

Ein weiterer sehr starker Aufschwung im Rahmen der Penicillin-Forschung wurde schließlich durch die Erstellung kommerziell attraktiver mikrobiologischer Methoden zur Herstellung von 6-Aminopenicillansäure gegeben, deren Acylierung zu einer explosiven Entwicklung der semi-synthetischen Penicilline führte.

Noch heute, 50 Jahre nach der Entdeckung von Penicillin durch Fleming, wird auf dem Gebiet der Penicilline intensiv gearbeitet, und es werden ständig neue Präparate beschrieben (Cooper, 1980).

Die intensiven Untersuchungen der Gattung Penicillium führten neben der großen Anzahl von Penicillinderivaten auch zur Entdeckung einer Vielzahl von Antibiotica, die verschiedenen anderen chemischen Gruppen zuzuordnen sind. Als ein Beispiel dieser bei Korzybski et al. (1967) aufgeführten Substanzen soll hier nur Griseofulvin genannt werden, das von Oxford et al. (1939) als erste isoliert wurde, heute als Fulcin S^R im Handel ist und bei Dermatomykosen eingesetzt werden kann (Mutschler, 1973).

Eines der vielen Teilgebiete im Rahmen der Ermittlungen an Schimmelpilzkulturen stellt neben den in einem kurzen Abriß geschilderten, für die Menschheit sehr wichtigen Gebieten der Penicillin-Forschung und der Isolierung neuer Antibiotica, die Untersuchung der von einigen Penicillium-Stämmen abgesonderten Pigmente dar.

Die nach der Einteilung der Schimmelpilze von Raper und Thom (1968) in eine Gruppe gehörigen Stämme Penicillium chrysogenum Thom, Penicillium notatum Westling, Penicillium cyaneo-fulvum Biourge und Penicillium meleagrinum Biourge sind neben anderen Merkmalen durch die Absonderung von gelben Pigmenten ins Medium gekennzeichnet.

Als Beispiele für die aus Penicillium chrysogenum isolierten Pigmente sollen hier Chrysogenin, ein hellgelbes Pigment, das von Clutterbuck et al. (1932) isoliert wurde, und Borothricin (Kuhn, 1943) genannt werden. Borothricin, das nur in Anwesenheit von Borsäure produziert wird, stellt ein gelbes, grün fluoreszierendes Pigment dar, das auch von Penicillium notatum und Penicillium meleagrinum synthetisiert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte aus Penicillium chrysogenum ein neues Pigment mit antibiotischer Wirksamkeit isoliert werden. Eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Herstellung, der Reinigung und Charakterisierung des gefundenen Antibioticums. Außerdem sollte versucht werden, Aufschlüsse über die Wirkungsweise der Substanz zu erhalten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Außer den hier aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma E. Merck AG, Darmstadt, verwendet.

2.1.1. Chemikalien für Nährmedien

Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Corn Meal Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Malt Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Nutrient Broth	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Foetal calf serum	Difco Bio-Cult Ltd., Scotland
D-Glucose	Deutsche Maizena Werke GmbH, Hamburg
D-(+)-Lactose	Riedel-De Häen, Seelze-Hannover
Lab Lemco Powder	Oxoid Ltd., London, England
(+)-Pantothenat, Calciumsalz	Calbiochem, Los Angeles, Cal., USA
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Merck AG, Darmstadt
RPMI 1640 Medium	Difco Bio-Cult Ltd., Scotland
Thiaminhydrochlorid	Calbiochem, Los Angeles, Cal., USA
Tween 80	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

2.1.2. Chemikalien für Fermentation und Aufarbeitung

Amberlite XAD-2	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

DC-Alufolien, Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0,2 mm	Merck AG, Darmstadt
Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie 0,040-0,063 mm (230-400 mesh ASTM)	Merck AG, Darmstadt
Niax Polyol	Brenntag, Mühlheim/Ruhr

2.1.3. Chemikalien für Antagonistenversuche

Albumin (aus Rinderserum)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
Bacto Casamino acids (vitamine free)	Difco Laboratories, Detroit, USA
Meerschweinchen-Komplement	Behringwerke AG, Marburg/Lahn

2.1.4. Radiochemikalien

L-(U-^{14}C)Alanin	159 mCi/mmol	50 µCi/ml
L-(5-^{3}H)Argininhydrochlorid	8,5 Ci/mmol	1 mCi/ml
L-(U-^{14}C)Asparagin	100 mCi/mmol	10 µCi/ml
L-(U-^{14}C)Isoleucin	342 mCi/mmol	50 µCi/ml
L-(U-^{14}C)Phenylalanin	513 mCi/mmol	50 µCi/ml
L-(5-^{3}H)Prolin	15 Ci/mmol	1 mCi/ml
(2-^{14}C)Thymidin	54 mCi/mmol	50 µCi/ml
(2-^{14}C)Uracil	62 mCi/mmol	125 µCi/ml
(5-^{3}H)UTP	2 Ci/mmol	1 mCi/ml

von Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England.

2.1.5. Chemikalien für Enzymversuche in vitro

ATP, CTP, GTP, UTP	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
DNA (aus Kalbsthymus)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
2-Mercaptoäthanol	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
Penicillinase (aus B. aureus) 40000 IE/mg	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
PBS (Dulbecco's Phosphate Bufferesed Saline)	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
RNA-Polymerase (aus E.coli)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
t-RNA (aus E.coli)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Tris	Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

2.1.6. Antibiotica zu Vergleichszwecken

Actinomycin C_3	Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld
Chloramphenicol	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Ochratoxin A	Heller, K., Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Tübingen
Rifamycin	Ciba-Geigy AG, Basel, Schweiz

Alle weiteren verwendeten Antibiotica stammen aus der Antibioticasammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie I, Tübingen.

2.2. Nährmedien

Alle Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 l Wasser. Nach Einstellen des pH-Wertes wurden die Nährmedien 20 Minuten bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung der entsprechenden flüssigen Nährlösungen wurden die jeweils angegebenen Agarmengen weggelassen.

2.2.1. Nährmedien für den Produzentenstamm

2.2.1.1. Medium zur Produktion von Disorbimycin

Asparagin	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5 g
NaCl	0,5 g
$CaCO_3$	0,2 g
Pepton	1,0 g
Lactose	20,0 g
Ölsäure	3,0 ml

2.2.1.2. Medium zur Anzucht von Impfkulturen

Asparagin	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5 g
NaCl	0,5 g
$CaCO_3$	0,2 g
Pepton	1,0 g
Glucose	10,0 g
Ölsäure	3,0 ml

2.2.2. Nährmedien zur Anzucht der Testkeime

Nr. 1 Hefe-Malz-Agar
(verändert nach Pridham et al., 1956/57)
4 g Hefeextrakt; 10 g Malzextrakt; 4 g Glucose;
20 g Agar; pH 7,3.

Nr. 2 Malz-Agar
20 g Malzextrakt; 20 g Agar.

Nr. 3 Nutrient Broth
(verändert nach Matthaei et al., 1972)
8 g Nutrient Broth; 5 g NaCl; pH 7,2.

Nr. 4 Plattenagar
(verändert nach Corbaz et al., 1957)
10 g Fleischextrakt; 10 g Pepton; 5 g NaCl;
15 g Agar; pH 7,2.

Nr. 5 Raulin-Thom Medium
(nach Raistrick & Rudman, 1956)
50 g Glucose; 2,7 g L-(+)-Weinsäure; 2,7 g Diammonium-D-tartrat; 0,4 g $(NH_4)_2HPO_4$; 16,7 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,4 g K_2CO_3; 0,34 g Magnesiumhydroxidcarbonat; 46,5 mg $FeSO_4 \times 7H_2O$; 46,5 mg $ZnSO_4 \times 7 H_2O$; pH 7,3.

Nr. 6 Medium für Clostridium pasteurianum
3 g Fleischextrakt; 3 g Malzextrakt; 3 g Hefeextrakt; 20 g Pepton; 5 g Dextrose (extra sterilisieren); 0,2 g Ascorbinsäure; 15 g Agar.

Nr. 7 Medium für Halobacterien
250 g NaCl; 10 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 5 g KCl; 0,2 g $CaCl_2 \times 2H_2O$; 10 g Hefeextrakt; 2,5 g Trypton; 15 g Agar; pH 7,0.

Nr. 8 Medium für Eurotium cristatum
20 g Malzextrakt; 300 g Glucose; 15 g Agar.

Nr. 9 Maismehlagar
17 g Corn Meal Agar; pH 6,0; entionisiertes Wasser.

Nr. 10 Def. Medium für Pilze
10 g Stärke; 2 g $(NH_4)_2HPO_4$; 5 g NaCl; 2 g K_2HPO_4; 1 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,4 g $CaCl_2$; 5 g Glycin; 20 mg $FeSO_4 \times 7 H_2O$; 10 mg $ZnSO_4 \times 7H_2O$; pH 7,2; entionisiertes Wasser.

Nr. 11 Def. Medium für Bakterien
8 g Glucose; 4 g Ammoniumtartrat; 5 g NaCl; 2 g K_2HPO_4; 1 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,2 g $CaCl_2 \times 2H_2O$; 10 mg $MnSO_4 \times 7H_2O$; 20 mg Ferrioxamin B; 15 g Agar; entionisiertes Wasser.

Nr. 12 Def. Medium für Bakterien
(verändert nach Davis & Mingioli, 1950)
3 g KH_2PO_4; 7 g K_2HPO_4; 0,1 g NaCl; 0,1 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1 g $(NH_4)_2SO_4$; 4 g Glucose (extra sterilisieren); 15 g Agar; entionisiertes Wasser.

Nr. 13 Def. Medium für Bacillus brevis
10 g Glucose; 0,5 g Asparagin; 0,5 g K_2HPO_4; 20 g Agar; pH 6,8; entionisiertes Wasser.

Nr. 14 Def. Medium für Bacillus subtilis-Mutanten
(verändert nach Swanton & Edlin, 1972)
2 g $(NH_4)_2SO_4$; 14 g K_2HPO_4; 6 g KH_2PO_4; 1 g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat; 0,2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,4 g Glucose (extra sterilisieren); 40 mg Lysin-monohydrochlorid; 40 mg Tryptophan; entionisiertes Wasser.

Nr. 15 Def. Medium zur Herstellung von E.coli-Protoplasten
3 g KH_2PO_4; 7 g K_2HPO_4; 0,5 g Tri-Natriumcitrat-2-hydrat; 0,1 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1 g $(NH_4)_2SO_4$; 2 g Glucose (extra sterilisieren); pH 6,8; entionisiertes Wasser.

Nr. 16 Glutamat-Medium
(verändert nach Eikhom et al., 1963)
13,6 g K_2HPO_4; 2 g $(NH_4)_2SO_4$; 5 g L-(+)-Glutaminsäure; 0,2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 10 mg $CaCl_2 \times 2H_2O$; 0,5 mg $FeSO_4 \times 7H_2O$; 2 g Agar; 10 ml Vitaminlösung (extra sterilisieren); entionisiertes Wasser.

Vitaminlösung
(verändert nach Eikhom et al., 1963)
2,4 mg (D-(+)-Biotin; 3,4 mg Thiaminhydrochlorid; 0,38 mg Riboflavin; 4,8 mg (+)-Pantothenat Calciumsalz; 1,9 mg Pyridoxalhydrochlorid; 2,4 mg Nicotinsäureamid; 100 ml entionisiertes Wasser.

2.2.3. Nährmedium für NS-1 Tumorzellen

100 ml RPMI 1640 Medium; 17 ml Foetal calf serum; 11 ml Zusatzmedium (100 ml RPMI 1640 Medium; 10 ml Antibiotic & Antimycotic solution; 20 ml Glutamin (0,2 M); 400 µl Mercaptoäthanollösung); (100 µl Mercaptoäthanol; 9,9 ml RPMI).

2.3. Versuchsorganismen

2.3.1. Bakterien

Pseudomonadales:
Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525
Pseudomonas saccharophila Doudoroff - ATCC 15946

Eubacteriales:
Achromobacter geminiani Ravenel, Institut für Mikrobiologie, Göttingen
Agrobacterium tumefaciens Cohn - ATCC 15955
Arthrobacter pascens Lochhead & Burton - ATCC 13346
Bacillus brevis Migula - ATCC 9999
Bacillus cereus N.R. Smith - ATCC 6464
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6051
Bacillus subtilis BR 16 RC^{rel}, RC^{str}, Prof. Fortnagel, Hamburg
Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013
Corynebacterium poinsettiae Starr & Pirone - ATCC 9682
Corynebacterium rathayi Dowsen - ATCC 13659
Corynebacterium spec. Wittler - ATCC 23830
Escherichia coli A 19/15
Escherichia coli B Weidel Sammlung
Escherichia coli D 22
Escherichia coli K 12 Stamm W 1485 - ATCC 12435
Halobacterium cutirubrum Lochhead - DSM 669
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn - ATCC 398
Micrococcus roseus Flügge - ATCC 186
Proteus vulgaris Hauser - ATCC 13315
Salmonella typhimurium LT2 (Loeffler) Castellani & Chalmers-Stocker, Stanford, University of California
Serratia marcescens - DSM 30122 Weihenstephan
Staphylococcus aureus - ATCC 11632 (Penicillin resistent)
Streptococcus faecalis - ATCC 9790

Actinomycetales:
Streptomyces antibioticus ssp. antibioticus - Tü 1718
Streptomyces cellulosae Waksman - ATCC 3313
Streptomyces violaceus-niger - Tü 1418
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman & Henrici - Tü 57 (= ETH 23575)

2.3.2. Pilze

Zygomycetes:
Mucor hiemalis (+) Wehmer - CBS 200.28 - Tü 179
Mucor hiemalis (-) Wehmer - CBS B 157 - Tü 180
Mucor miehei Cooney & Emerson - ETH M 52 - Tü 284

Ascomycetes und zugehörige Deuteromycetes:
Ascoidea rubescens - Tü 195
Candida albicans (Robin) Berhout - Tü 565
Eurotium cristatum (Raper & Fernnell) Malloch & Cain - CBS 123.53 (= ETH 8295)
Saccharomyces cerevisiae Hansen - Tü 125
Schizosaccharomyces pombe Lindner-(-) - Tü 501

Alternaria kikuchiana Tanaka - Tü 169
Aspergillus deflectus - CBS 109.55 - Tü 699
Aspergillus panamensis - CBS 120.45 - Tü 704
Botrytis cinerea Persoon & Fries - Tü 157
Curvularia spec. - Tü 627
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart & Grigorakis - Tü 282
Paecilomyces varioti Bainier - Tü 137 (= ETH M 4646)

2.4. Methoden zur Herstellung von Disorbimycin

2.4.1. Fermentation des Antibioticums

2.4.1.1. Kulturen im Erlenmeyerkolben

500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich wurden mit 100 ml Nährlösung (vgl. 2.2.1.1.) gefüllt, nach dem Autoklavieren mit einer auf HA-Schrägröhrchen gezogenen Kultur von Penicillium chrysogenum Thom beimpft und auf der Schüttelmaschine bei 120 Upm und 27°C inkubiert. Nach 96 Std. war in der Regel das Maximum der Antibioticumbildung erreicht.

2.4.1.2. 10 l Fermenter

Fermenter mit 10 l Nutzinhalt (Modell MF-14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA) wurden mit 10 l Nährlösung beschickt, 30 min bei 134°C sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 0,5 l einer 72 Std. alten Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C, 200 Upm des Blattrührers und 3 l Luft pro Minute. Die Fermentation dauerte ca. 97 Std.

2.4.1.3. 25 l Fermenter

Dieser Fermenter Typ b 25 (Braun/Melsungen) arbeitet im Gegensatz zum 10 l Fermenter mit einem Umwurfsystem, durch das erheblich bessere Belüftungswerte erreicht werden können. Sterilisiert wurde in situ 20 min bei 121°C, die Impfmenge betrug 5 % des Nutzvolumens. Es wurde bei 27°C, 800 Umwürfen pro Minute und 9 l Luft pro Minute 46 Std. fermentiert.

2.4.1.4. 20 und 200 l Fermenter

Beide Fermentertypen verfügen über ein Umwurfsystem. Der 20 l Fermenter (Modell b 20, AG für biologische Verfahrenstechnik, Basel; Fabrikation und Verkauf: Giovanola Frères SA., Monthey, Schweiz) enthielt 19 l Nährlösung (vgl. 2.2.1.2.), wurde in situ 20 min bei 121°C sterilisiert und mit 5 % einer 72 Std. alten Vorkultur beimpft. Bei 27°C und 800 Umwürfen pro Minute wurden 900 l Luft pro Stunde in die Kulturflüssigkeit eingeleitet.

Diese Kultur diente nach 72 Std. Inkubation als Impfmaterial für den 200 l Fermenter (Typ b 200, AG für biologische Verfahrenstechnik, Basel, Schweiz), der unter folgenden Bedingungen betrieben wurde: Medium (vgl. 2.2.1.1.), 27°C, 800 Umwürfe pro Minute, 5500 l Luft pro Stunde. Die Ernte erfolgte nach 45 Std.

Schaumbildung im Fermenter wurde durch Zugabe weniger Tropfen äthanolischer Niax Polyollösung unterbunden.

2.4.2. Fermentationsanalyse

2.4.2.1. pH-Messung

Zur in situ pH-Messung im 20 und 200 l Fermenter diente eine sterilisierbare pH-Elektrode (Typ 465 VT der Fa. Ingold, Urdorf, Schweiz). Der pH-Wert der übrigen Kulturproben wurde mit einem Labor-pH-Meter gemessen.

2.4.2.2. Sedimentbestimmung

Das Mycelvolumen im Kulturfiltrat wurde durch Zentrifugation (Christ II KS, 20°C, 3000 Upm, 10 min) von 10 ml Kultur in graduierten Zentrifugengläsern ermittelt.

2.4.2.3. Glucosebestimmung

Der Glucosegehalt im Kulturfiltrat wurde nach Bergmeyer (1974) mit einem Reagentiensatz der Firma Merck, Darmstadt, bestimmt.

2.4.2.4. Lactosebestimmung

Die Bestimmung des Lactosegehaltes der Fermentationsproben erfolgte nach Kurz & Wallenfels (1974) und wurde mit einem Testsatz der Firma Boehringer/Ingelheim durchgeführt.

2.4.2.5. Disorbimycinkonzentration

Proben definierten Volumens wurden mit Chloroform extrahiert, der Extrakt dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und das Antibioticum mit Methanol eluiert. Anhand einer Eichkurve, die die Abhängigkeit der Extinktion bei 370 nm von der Disorbimycinkonzentration zeigt, konnte die Disorbimycinkonzentration der Fermentationsproben bestimmt werden. Dieses Verfahren diente auch zur Ermittlung des optimalen Erntezeitpunktes.

2.4.3. Isolierung des Antibioticums

2.4.3.1. Erste Anreicherung

Die Kultur wurde mit einer Filterpresse (Firma Schwenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Da im Mycel keine antibiotische Aktivität nachzuweisen war, wurde es verworfen.
Das Kulturfiltrat wurde mit 0,1 N HCl auf pH 5-6 eingestellt und über eine mit Amberlite XAD-2 gefüllte Säule gegeben, wobei ca. 100 g XAD-2 für einen Liter Kulturfiltrat

verwendet wurden. Anschließend wurde die Säule mit Wasser und Methanol/Wasser 50/50 (v/v) gewaschen. Die Desorption von Disorbimycin erfolgte mit Methanol.

2.4.3.2. Weitere Reinigungsschritte

Extraktion mit Essigester

Das eingeengte Eluat der Amberlite XAD-2 Säule wurde mit 30 %, 20 % und 10 % Essigester (v/v) extrahiert und am Rotationsverdampfer zur Trockene einrotiert.

Säulenchromatographie

Der nächste Reinigungsschritt erfolgte an einer Kieselgelsäule. Um eine exaktere Trennung der verschiedenen Banden zu erhalten, wurde Kieselgel 60 in einer Lösung von 9,3 g KH_2PO_4 in 1 l entionisiertem Wasser aufgeschlämmt (pH 4,6), abzentrifugiert und bei 100°C im Trockenschrank getrocknet.[1)] Anschließend wurde die Säule mit dem vorbehandelten Kieselgel in Chloroform beschickt. Der im Laufmittel der Kieselgelsäule (Chloroform/Methanol 90/10 (v/v)) gelöste Essigesterextrakt wurde aufgetragen und die Säule eluiert.

Auf dieser Reinheitsstufe wurde das Produkt zur weiteren Reinigung und zur Strukturaufklärung an das Org.-Chem. Laboratorium, Göttingen, von Herrn Zeeck abgegeben und von Herrn H. Eiffert bearbeitet.

[1)] Für diesen Hinweis danke ich Herrn H. Eiffert, Arbeitskreis Zeeck, Org.-Chem. Institut Göttingen.

2.5. Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung des Antibioticums

2.5.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Reinheitsprüfung und Identifizierung von Disorbimycin. Es wurden fertige Dünnschichtplatten der Firma Merck (Kieselgel 60, F 254, Schichtdicke 0,25 mm) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Stahl (1967).

2.5.2. Spektren

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte in methanolischer Lösung, die der IR-Spektren mit der KBr-Presstechnik. Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden in deuteriertem Chloroform angefertigt.

2.6. Methoden zur biologischen Charakterisierung des Antibioticums

2.6.1. Plattendiffusionstest

Dieser nach Zähner und Maas (1972) durchgeführte Test diente zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Antibioticumsaktivität.

2.6.1.1. Testplatten mit Bacillus brevis und Bacillus subtilis

Die Herstellung der Platten erfolgte mit Sporensuspensionen, die nach der Beschreibung von Wolf (1971) angefertigt wurden.

2.6.1.2. Testplatten zum Wirkungsspektrum

In Schüttelkulturen wurden die Zellen ca. 18 Std. (bei langsam wachsenden Organismen auch länger) in der optimalen Nährlösung angezogen. Von diesen Vorkulturen (E_{578} = 1,0) wurde 1 ml in 100 ml 40°C warmen Agar gegeben und in 10 ml Portionen in sterile Polystyrol-Petrischalen (Fa. Greiner, Nürtingen) gegossen.
Die Anfertigung der Platten von Clostridium pasteurianum ist bei Santo (1976), von Mucor hiemalis bei Kirst (1971) und von Paecilomyces varioti bei Höhne (1974) beschrieben. Der Test an der Riesenkolonie von Botrytis cinerea erfolgte nach Hütter et al. (1965).

2.6.2. Kreuztest

Die Testanordnung ist bei Bonifas (1952), Juillard (1957) und Zähner et al. (1960) beschrieben.

2.6.3. Verdünnungsreihentest

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) antibakteriell wirksamer Substanzen wurde der Verdünnungsreihentest angewendet.
Von 16-18 Stunden gewachsenen Kulturen der entsprechenden Testorganismen wurde 1 ml auf frisches Medium überimpft. Sterile Reagensgläser wurden mit 2 ml dieser Suspension und 100 µl der entsprechenden Hemmstofflösung beschickt und bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 16-24 Stunden erfolgte optische Auswertung im Vergleich zum Kontrollansatz, dem 100 µl reines Lösungsmittel zupipettiert worden war. Diejenige Konzentration des Antibioticums wurde als MHK bezeichnet, bei der im Vergleich zum Kontrollansatz mit bloßem Auge kein Wachstum mehr zu erkennen war.

2.6.4. Bioautographie

Die Durchführung erfolgte in gleicher Weise wie bei Kirst (1971).

2.6.5. Penicillinase-Test

1 ml einer Lösung von Disorbimycin in Methanol wurde mit 100 µl eines Ansatzes von 1 mg Penicillinase in 1 ml entionisiertem Wasser versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aktivität dieser Lösung und eines entsprechenden, unbehandelten Disorbimycinansatzes wurde auf Bacillus subtilis ermittelt.
Entsprechend wurde auch während der Fermentation und Aufarbeitung auf β-Lactamase empfindliche Antibiotica geprüft.

2.6.6. Biophotometerversuche

Mit Hilfe eines Biophotometers (Firma Jouan, Paris), das bei Poralla (1967) und Coultas & Hutchinson (1962) beschrieben ist, kann das Wachstum von Bakterien turbidometrisch verfolgt werden.
Aus einer Vorkultur von Bacillus brevis, die 16-18 Stunden auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 120 Upm und 37°C in Medium 3 gewachsen war, wurden 2 ml auf Medium 16 überimpft. Sobald diese Kultur bei 578 nm eine Transmission von 90 % erreicht hatte, wurden die Biophotometerküvetten mit jeweils 5 ml dieser Suspension beimpft, im Biophotometer auf Transmission 90 abgeglichen und bei 37°C mit maximaler Belüftung inkubiert. Das Antibioticum, in 50 µl gelöst, wurde zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten zupipettiert, der Kontrollküvette gab man das entsprechende Aliquot an reinem Methanol zu.

Versuche mit Bacillus subtilis wurden entsprechend durchgeführt, nur erfolgte die Aufnahme der Wachstumskurven in Medium 12.

2.7. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise

2.7.1. Herstellung von Escherichia coli-Protoplasten

Die Herstellung der Protoplasten von Escherichia coli K 12 erfolgte in abgewandelter Form nach der Methode von Osborn et al. (1972).

Die Zellen wurden in Medium 15 bei 37°C angezogen und bei E_{578} = 0,7 durch Zentrifugation (Christ II KS, 20°C, 4500 Upm, 10 Minuten) geerntet. Das Sediment wurde in 25 ml 0,2 M TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0) mit 0,5 mmol EDTA und 0,25 M Saccharose aufgenommen und nach Zusatz von Lysozym (25 µg/ml) 15 Minuten inkubiert.
Die Wirkung von Disorbimycin auf die durch Lysozymbehandlung entstandener Protoplasten konnte durch Messen der Extinktion bei 578 nm im Eppendorf Photometer verfolgt werden.

2.7.2. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil und Isoleucin

Zur Bestimmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese unter Einfluß eines Antibioticums wurde die Einbaurate radiomarkierter Vorstufen in die Bakterienzelle gemessen (Siddhikol et al., 1969).

Für diese Einbauversuche wurden 25 ml Erlenmeyerkolben mit 1 seitlichen Einstich mit 5 ml einer Kultur von Bacillus subtilis im Medium 12, deren Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, beimpft. Sobald diese Kultu-

ren, die bei 37°C inkubiert wurden, bei 578 nm eine Extinktion von 0,125 erreicht hatten, wurden die radioaktiven Vorstufen in folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

(^{14}C)Thymidin : 0,1 µCi/ml
(^{14}C)Uracil : 0,2 µCi/ml
(^{14}C)Isoleucin: 0,2 µCi/ml
L-(+)Isoleucin: 2,0 µg/ml

Nach 10 Minuten erfolgte die Zugabe des Antibioticums und des jeweiligen Vergleichsantibioticums, deren Konzentrationen im Ergebnisteil angegeben sind. Zu den angegebenen Zeiten wurden aus den Kulturen 200 µl Proben entnommen und in 2 ml eiskalte 5 %ige Trichloressigsäure (TCA) pipettiert, um das Wachstum der Zellen zu unterbrechen und damit einen weiteren Einbau der radioaktiven Vorstufen zu unterbinden (Koschel et al., 1966).
Nach Abschluß des Versuches wurden alle Proben durch Membranfilter (0,45 nm Porenweite, 25 mm Durchmesser, Satorius Membranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt, dreimal mit TCA gewaschen und 1 Stunde bei 60°C getrocknet. Die Radioaktivität des säureunlöslichen Rückstandes wurde in 5 ml Scintillationsflüssigkeit (4 g PPO auf 1 l Toluol) mit einem 3-Kanal-Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer (Mark I, Modell 8660, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA) gemessen.

Einbauversuche mit (^{14}C)Uracil in Bacillus subtilis BR 16 RC^{str} und RC^{rel} wurden entsprechend durchgeführt.[1)] Diese Lysin und Tryptophan auxotrophen Mutanten nach Swanton & Edlin (1972) wurden in Medium 14 angezogen. Um einen zu schnellen Einbau der radioaktiven Vorstufen zu vermeiden, wurden pro Ansatz 40 µg Uracil zugesetzt. Die Antibioticumzugabe erfolgte 5 Minuten nach Beginn der Reaktion.
Als Vergleichsantibioticum wurde für diese Einbauversuche Ochratoxin A in einer Konzentration von 15 µg/ml herangezo-

---

[1)] Herrn Prof. Fortnagel, Institut für Allgemeine Botanik, Hamburg, danke ich für die Zusendung der Mutanten.

gen.[1] Nach Singer (1973) mußte die Versuchsdurchführung bei pH 6 erfolgen, da eine Erhöhung des pH-Wertes eine weitgehende Aufhebung der Hemmwirkung des Antibioticums mit sich bringt.

2.7.3. RNA-Synthese in vitro

Die Versuche zur Hemmung der RNA-Synthese in vitro wurden nach Fuchs et al. (1967) durchgeführt.

Ein Testansatz von 0,1 ml enthielt: 0,05 mg/ml DNA; je 1 mmol ATP, CTP, GTP; 1 mmol (^{14}C)UTP; 0,03 M TRIS-Acetat-Puffer (pH 7,9); 0,03 M Mg^{++}-Acetat; 0,13 M NH_4Cl; 40 µg/ml DNA-abhängige RNA-Polymerase und die jeweiligen Antibioticummengen in Aceton gelöst oder für die Kontrolle die entsprechenden Mengen an Aceton.
Das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad vorbereitet. Nach 20 Minuten Inkubation im Wasserbad bei 37°C unter ständigem, schwachem Schütteln wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,6 ml Eiswasser gestoppt. Die Proben wurden gut durchgemischt und mit 0,7 ml 5 %iger Trichloressigsäure versetzt. Wie unter 2.7.2. beschrieben, wurden die Proben durch Membranfilter abgesaugt, gewaschen und die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität gemessen.

2.7.4. Interaktionen mit DNA

Die DNA-abhängige RNA-Synthese kann durch Wechselwirkungen eines Antibioticums mit der Doppelstrang-DNA gehemmt werden (Kersten & Kersten, 1974). Eine gängige Methode, solche In-

---

[1] Herrn K. Heller, Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Tübingen, danke ich für die Überlassung von Ochratoxin A.

teraktionen zu demonstrieren, ist die Spektroskopie im sichtbaren Bereich (Swanbeck, 1966). Kommt eine Wechselwirkung zwischen einer gefärbten Substanz und DNA zustande, so tritt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längerwelligen Bereich auf.

Zur Durchführung des Versuches wurden 100 mg DNA in einem Liter Pufferlösung mit 0,75 mmol Na_2HPO_4 und 0,25 mmol NaH_2PO_4 gelöst. Zu 500 ml dieser Lösung wurden 2 mg Disorbimycin in 2,5 ml Äthanol zugegeben. Anschließend wurden die Sprektren dieser beiden Ansätze in einem Beckman Spektralphotometer DB-GT mit 10-Zoll-Laborschreiber (Beckman Instruments GmbH, München) gegen reine Pufferlösung aufgenommen. Da eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Antibioticums unter Umständen erst nach 24 Stunden eintritt, wurde die Messung nach 24 Stunden wiederholt.

2.7.5. Zellfreie Proteinsynthese

In diesem Versuch wurde der Einfluß von Disorbimycin auf die Proteinsynthese in vitro geprüft. Die durch Poly(U) stimulierte Poly(Phe)-Synthese erfolgte nach den bei Traub et al. (1971) und Nirenberg & Matthaei (1961) beschriebenen Methoden. Die Präparation der S100 Fraktion und der Ribosomen aus Escherichia coli erfolgte nach Staehelin & Maglott (1971).

Zur Durchführung des Testes wurden folgende Lösungen angesetzt:

Puffer: 50 mmol TRIS-HCl (pH 7,8); 10 mmol $MgCl_2$; 50 mmol NH_4Cl; 1 mmol Dithioerythrit.

Mix A: 500 µl Puffer; 10 µl ATP (50 mmol); 10 µl GTP (50 mmol); 10 µl t-RNA (5 mg/ml); 20 µl Phosphoenolpyruvat (50 mmol); 5 µl Pyruvatkinase (10 mg/ml); 20 µl Ribosomen (A-260-Einheit: 250); 20 µl S100 (110 mg Protein/ml).

Mix B: 250 µl Puffer; 10 µl (^{14}C)Phenylalanin; 20 µl Poly(U).

Zu 100 µl Mix A wurden 2 µl Antibioticum (gelöst in Methanol, Konzentration s. Ergebnisteil) gegeben und die Reaktion mit 50 µl Mix B gestartet. Nach 20 Minuten Inkubation dieses Testansatzes bei 30°C wurden die Proben von 140 µl auf Glasfaser-Filter (Whatman 3 MM-Filter, Durchmesser 23 mm, W. & R. Balston Ltd., Maidstone, England) pipettiert und diese in kalte 10 %ige Trichloressigsäure (TCA) gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Zur hydrolytischen Spaltung des Aminoacyl-t-RNA-Esters wurde die TCA mit den Filtern 10 Minuten auf 90°C erhitzt. Anschließend wurden die Filter dreimal mit 5 %iger TCA, mit Äthanol/Äther 1/1 (v/v) und Äther gewaschen.

Die Radioaktivität auf den trockenen Filtern wurde wie unter 2.7.2. beschrieben gemessen.

Herrn H. Wolf danke ich für die Durchführung dieses Versuches.

2.7.6. Beladung der t-RNA in vitro

Die Beladung der t-RNA unter Einfluß von Disorbimycin wurde in folgendem Versuch, modifiziert nach Kelmers (1966), untersucht.
Die Präparation der S100 Fraktion und die Herstellung des Puffers erfolgte wie unter 2.7.5. beschrieben.

Mix A: 500 µl Puffer; 20 µl ATP (50 mmol, pH 7); 20 µl t-RNA (5 mg/ml); 40 µl (^{14}C)Alanin.

Mix B: 100 µl Puffer; 10 µl S100.

Testansatz: 50 µl Mix A; 1 µl methanolischer Disorbimycinlösung (2,5; 0,5; 0,05; 0,005 mg/ml); 10 µl Mix B.

Das Reaktionsgemisch wurde 10 Minuten bei 30°C inkubiert, eine Probe von 50 µl entnommen, auf 3 MM-Filter pipettiert,

diese in kalte 10 %ige Trichloressigsäure überführt und wie unter 2.7.5. (ohne Hydrolyse) beschrieben gewaschen und die Radioaktivität gemessen.
Außer mit (^{14}C)Alanin wurde dieser Versuch auch mit jeweils 2 µCi (^{3}H)Argininmonochlorid, (^{3}H)Prolin und (^{14}C)Asparagin durchgeführt.

2.7.7. Messung an Lipidvesikeln

Das Maß für die ausgetretenen Kalium- bzw. Natrium- und Lithium-Ionen kann indirekt über die in Liposomen eingetretenen H^{+}-Ionen (Henderson et al., 1969) durch eine pH-Messung im Außenmedium der Liposomen bestimmt werden.

Die Präparation der Liposomen ist bei Frosch (1979) beschrieben. Der pH-Sprung wird mit einem Schreiber aufgezeichnet. Die Messung fand bei 25°C in einer Meßzelle statt.

Meßansatz: 0,2 ml Liposomenlösung
0,8 ml 0,4 M Sucroselösung (2,5 mmol $MgSO_4$)
5 µl Antibioticumlösung (1 mg/ml Methanol)

Für die Durchführung dieses Versuches danke dich Herrn W. Wörner.

2.7.8. Test auf toxische Wirkung

2.7.8.1. Test an NS-1 Tumorzellen

Hierbei wurde die Wirkung von Disorbimycin auf NS-1 Tumorzellen mit Actinomycin C verglichen. 5 ml von dem vorbereiteten Medium (vgl. 2.2.3.) wurden in 30 ml Fläschchen (Castor, Dynatech Laboratories, 900 Slaters Lane, Alexandria, Virginia, USA) pipettiert und mit Zellsuspension angeimpft, so

daß eine Zelldichte von ca. 200000/ml entstand. Bei dieser Zelldichte ist nach Komischke (1980) ein logarithmisches Wachstum zu erwarten. Die Antibiotica wurden in Konzentrationen zwischen 0,001 und 10 µg/ml angeboten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C mit 5 % CO_2-Gehalt. Alle 24 Stunden wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen bei 400 g abzentrifugiert, verdünnt und 40 µl davon mit 40 µl Zellzähllösung gemischt. Die Zellzähllösung bestand aus 5 ml PBS mit 5 µl Fluoresceinlösung (5 mg Fluoresceindiacetat/ml Aceton) und war jeweils frisch anzusetzen. Die Zellen wurden in einem Fluorescenzmikroskop (Zeiss) mittels einer Thoma-Zählkammer ausgezählt.

Herrn M. Wanning danke ich für die Durchführung dieses Versuches.

2.7.8.2. Test auf höhere Organismen

Dieser Versuch nach Tejmar-Kolar (1980) wurde mit Dinophilus gyrociliatus, einem der Gattung der Archannelidae zugehörigem Organismus (Grell, 1954), durchgeführt. Dinophilus gyrociliatus stellt einen Wirtsorganismus für Eucoccidium dinophili dar und kann mit diesem parasitischen Protozoon infiziert werden. In Konzentrationen von 10-50 µg/ml wurde Disorbimycin auf seine Toxizität und seine Wirkung auf Protozoen untersucht.

Für die Durchführung dieses Versuches danke ich Frau Tejmar-Kolar.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Bestimmung des Produzentenstammes

Der Produzentenstamm wurde vom Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande als Penicillium chrysogenum Thom identifiziert. Diese Art ist bei Raper & Thom (1968) ausführlich beschrieben.

3.2. Herstellung von Disorbimycin

3.2.1. Optimierung

Um eine höhere Antibioticumkonzentration im Kulturfiltrat zu erzielen, wurde versucht, die optimalen Produktionsbedingungen für Penicillium chrysogenum Thom im Kolbenversuch zu finden.

Hierzu wurde Glucose, die Kohlenstoffquelle des ursprünglich verwendeten Mediums (vgl. 2.2.1.2.), durch jeweils 2 % Glycerin, Lactose, Mannit und Stärke ersetzt. Es zeigte sich, daß mit Lactose als Kohlenstoffquelle die beste Ausbeute an Disorbimycin erzielt werden konnte. Das stärkste Wachstum des Produzentenstammes jedoch wurde mit Glucose erreicht, was zur Anzucht von Impfkulturen ausgenützt wurde.
Einen starken Einfluß auf die Produktion von Disorbimycin hatte der Zusatz von Ölsäure, denn ohne diese ungesättigte Fettsäure erfolgte keine Synthese des Antibioticums.
In den zusätzlich zur Optimierung herangezogenen Medien 5 und 10, die häufig zur Anzucht von Pilzen verwendet werden, erfolgte zwar Wachstum des Produzentenstammes, aber keine Produktion von Disorbimycin.

Variationen der Impfmenge und des Impfalters ergaben, daß

sich die höchste Ausbeute mit 1-5 % einer 72 Stunden alten Vorkultur erreichen ließ. Die Belüftung spielte eine untergeordnete Rolle.

3.2.2. Fermentation des Antibioticums

Größere Antibioticamengen wurden im 10, 25 und 200 l Fermenter hergestellt. Die Bedingungen sind unter 2.4.1. beschrieben.

Der Verlauf einer 10 l Fermentation ist in Abb. 1 wiedergegeben.

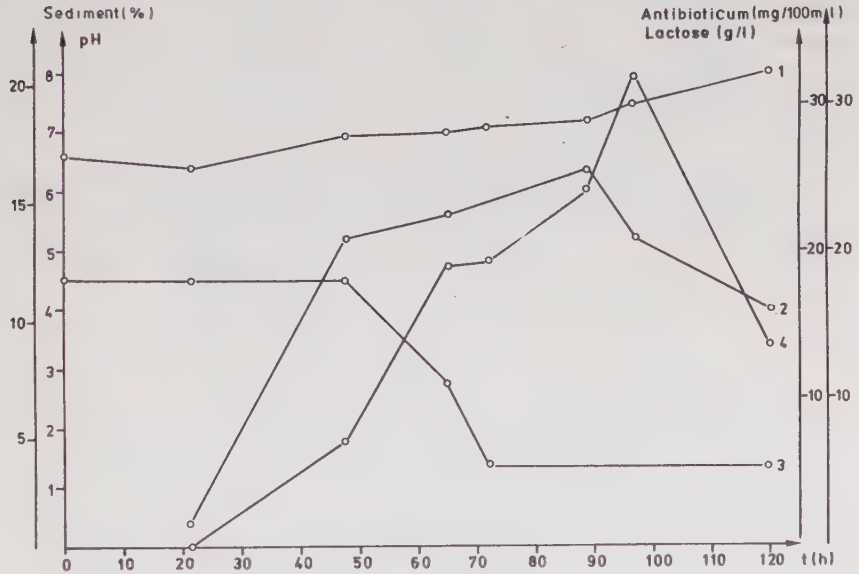


Abb. 1: Fermentationsverlauf im 10 l Fermenter mit Blattrührer und Lactose als Kohlenstoffquelle.

1 pH-Wert
2 Sediment
3 Lactosegehalt
4 Disorbimycinkonzentration

Disorbimycin wird hauptsächlich gegen Ende der Wachstumsphase gebildet. Bei einsetzender Lyse der Zellen des Produzentenstammes wird nach 97 Stunden Inkubation das Maximum der Antibioticumkonzentration erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist mit dem bloßen Auge keine Ölsäure mehr sichtbar. Die Lactoseverwertung setzt erst bei beginnender Synthese von Disorbimycin ein, es erfolgt jedoch kein vollständiger Abbau der Kohlenstoffquelle.
Wird die Kultur über den optimalen Erntezeitpunkt hinaus weiterinkubiert, so nimmt die Konzentration des Antibioticums stark ab.

Abb. 2 zeigt den Fermentationsverlauf im 25 l Fermenter, welcher mit einem Intensor anstelle eines Blattrührers ausgestattet ist. Im Vergleich zur 10 l Fermentation mit einem Produktionsmaximum nach 97 Stunden wurde hier die höchste Antibioticumkonzentration schon nach 46 Stunden erreicht. Der Erntezeitpunkt liegt also im 25 l Fermenter 51 Stunden früher, was wahrscheinlich auf die durch das Umwurfsystem bedingte bessere Belüftung und Substratverteilung zurückzuführen ist. Die Ausbeute an Antibioticum erhöhte sich im Vergleich zum 10 l Fermenter nur um 3 %, die Biomasse stieg auf das Doppelte an. Die Produktion von Disorbimycin setzte erst nach der Lactoseverwertung ein.

Der Fermentation im 200 l Fermenter ging eine Anzucht des Produzentenstammes im 20 l Fermenter voraus (Abb. 3).
Zur Herstellung dieser Kultur wurde das unter 2.2.1.2. beschriebene Medium verwendet, dem im Gegensatz zum Produktionsmedium (vgl. 2.2.1.1.) Glucose als Kohlenstoffquelle zugesetzt worden war.
Vergleicht man die Fermentationsverläufe im 20 und 25 l Fermenter, so zeigt sich im gleichen System mit unterschiedlicher Kohlenstoffquelle eine Verschiebung des optimalen Erntezeitpunktes. Das Produktionsmaximum wird mit Glucose als Kohlenstoffquelle erst nach 96 Stunden erreicht und beträgt nur etwa 29 % einer Fermentation mit Lactose. Die Lyse der Zellen setzt schon nach 52 Stunden ein, was durch Nährstoffverknappung bedingt sein könnte.

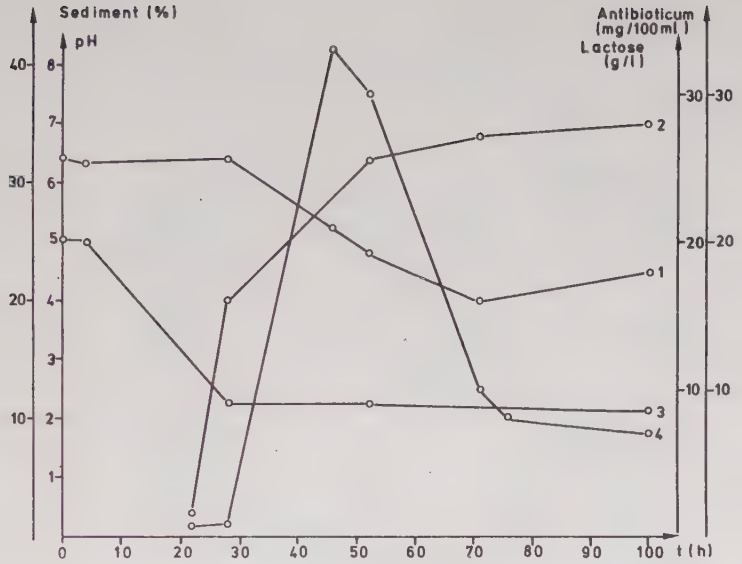


Abb. 2: Fermentationsverlauf im 25 l Fermenter mit Umwurfsystem und Lactose als Kohlenstoffquelle.

1 pH-Wert
2 Sediment
3 Lactosegehalt
4 Disorbimycinkonzentration

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, wäre aufgrund der früh einsetzenden Lyse ein Überimpfen der 20 l Kultur auf den 200 l Fermenter zu einem früheren Zeitpunkt sinnvoll gewesen.

In Abb. 4 ist der Verlauf einer Fermentation im 200 l Fermenter dargestellt. Die Anzucht entspricht weitgehend der im 25 l Fermenter. Wie bei allen Fermentationen tritt auch hier nur ein sehr enges Produktionsmaximum auf.

Zur Herstellung größerer Mengen von Disorbimycin wurde das Fermentationssystem mit Intensor dem mit Blattrührer vorgezogen, da im Umwurfsystem höhere Ausbeuten erzielt werden

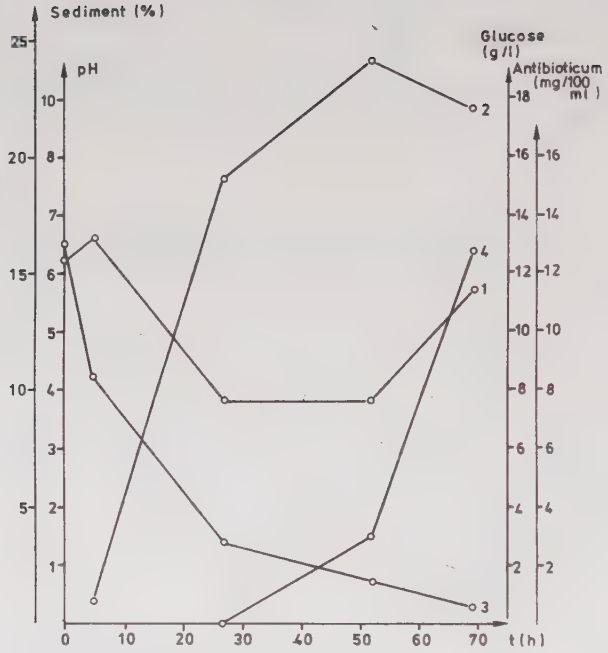


Abb. 3: Fermentationsverlauf im 20 l Fermenter mit Umwurfsystem und Glucose als Kohlenstoffquelle.

1 pH-Wert
2 Sediment
3 Glucosegehalt
4 Disorbimycinkonzentration

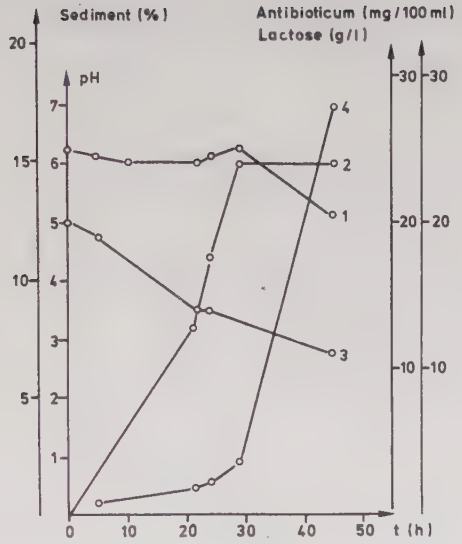


Abb. 4: Fermentationsverlauf im 200 l Fermenter mit Umwurfsystem und Lactose als Kohlenstoffquelle.

1 pH-Wert
2 Sediment
3 Lactosegehalt
4 Disorbimycinkonzentration

konnten und der optimale Erntezeitpunkt früher erreicht war, wodurch das Infektionsrisiko vermindert wurde.

Die Bestimmung des Erntezeitpunktes erfolgte nach der unter 2.4.2.5. beschriebenen Methode.
Häufig wird der Plattendiffusionstest zur Ermittlung des Antibioticumgehaltes herangezogen. Da bis zu dessen Auswertung jedoch 16-18 Stunden vergehen, ist er aufgrund des engen Produktionsmaximums des Produzentenstammes als Erntekriterium nicht geeignet.

Im Penicillinasetest (vgl. 2.6.5.) konnte festgestellt werden, daß Penicillium chrysogenum Thom außer Disorbimycin noch ein β-Lactamase instabiles Antibioticum produziert. Diese Aktivität wurde nicht weiter verfolgt.

3.2.3. Isolierung des Antibioticums

Die Kultur wurde zum optimalen Zeitpunkt (vgl. 2.4.1.) geerntet und Disorbimycin nach dem in Abb. 5 aufgezeichneten Aufarbeitungsschema isoliert.

Disorbimycin lag nach diesen Aufarbeitungsschritten noch nicht als chromatographisch reine Substanz vor. Die weitere Reinigung wurde von Herrn H. Eiffert, Arbeitskreis Zeeck, Org.-Chem. Institut, Göttingen, vorgenommen. Sie bestand in zweimaliger Chromatographie an Kieselgelplatten (Phosphatpuffer pH 4,6; System Chloroform/Methanol 9/1), Chromatographie an Sephadex LH 20 in Methanol und Umfällen aus n-Pentan.

Das vom Produzentenstamm zusätzlich gebildete Antibioticum wirkt ebenso wie Disorbimycin auf die Testorganismen Bacillus brevis und Bacillus subtilis, ist aber im Gegensatz zu Disorbimycin Penicillinase instabil (vgl. 2.6.5.). Durch dieses unterschiedliche Verhalten konnte jede der beiden Aktivitäten während der verschiedenen Aufarbeitungsschritte gesondert verfolgt werden.

Der größte Teil der Nebenaktivität wurde beim Behandeln der XAD-2-Säule mit Methanol/Wasser abgetrennt. Der Rest blieb bei der Extraktion mit Essigester in der wässrigen Phase zurück. Die Nebenaktivität wurde nicht weiter verfolgt.

Im Methanol/Wasser-Eluat der XAD-2-Säule konnten noch Spuren von Disorbimycin nachgewiesen werden, die nach Extraktion dieses eingeengten Eluats mit Essigester dem eigentlichen Essigesterextrakt zugeführt werden konnten.

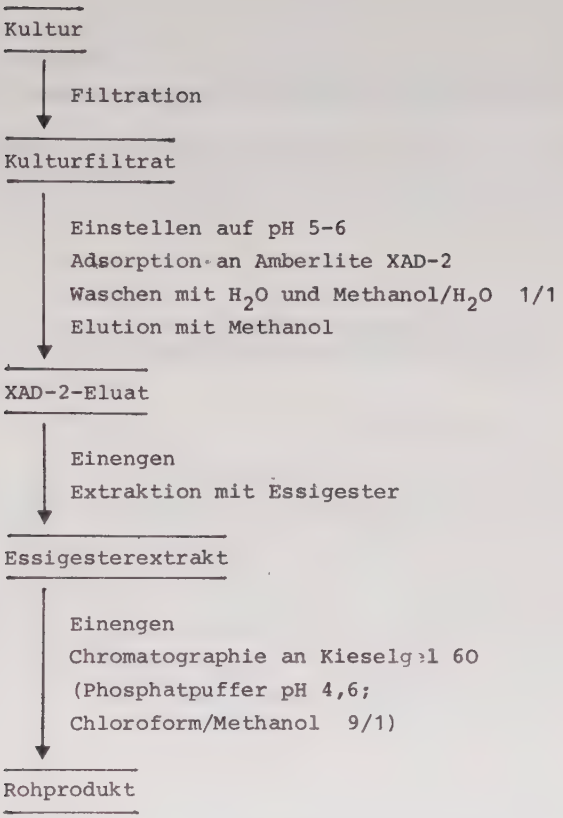


Abb. 5: Schematische Darstellung der Aufarbeitung und Reinigung von Disorbimycin.

Aufgrund der Labilität von Disorbimycin (vgl. 3.4.3.) wurde bei der Isolierung des Antibioticums grundsätzlich versucht, die Aufarbeitungsschritte unter geringer Lichteinwirkung so rasch als möglich durchzuführen. Auf ein Auswaschen von lipophileren Substanzen von der Kieselgelsäule mit Chloroform wurde aus diesem Grunde verzichtet.

Eine exakte Bilanz von den verschiedenen Aufarbeitungsschritten konnte aufgrund der Instabilität des Antibioticums nicht aufgestellt werden.

3.3. Physikalische Charakterisierung

3.3.1. Löslichkeit

Disorbimycin ist gut löslich in den organischen Lösungsmitteln Methanol, Äthanol, Essigester, Toluol und Chloroform. In Wasser ist das Antibioticum nahezu unlöslich, in wässriger Natronlauge dagegen kann es gut in Lösung gebracht werden, nach Zugabe von Säure fällt es wieder aus. Letzteres Verhalten läßt erkennen, daß es sich bei Disorbimycin um eine saure Verbindung handeln muß.

3.4. Chemische Charakterisierung

Die Strukturaufklärung des Antibioticums liegt in den Händen von Herrn H. Eiffert, Arbeitskreis Zeeck, Org.-Chem. Institut, Göttingen.
Eine vollständige Aufklärung der Struktur von Disorbimycin war bis jetzt noch nicht möglich. Jedoch konnte Sorbimycin, ein Abbauprodukt des Antibioticums mit Partialstruktur von Disorbimycin, charakterisiert werden.
Herrn H. Eiffert möchte ich an dieser Stelle für die Über-

lassung der von Disorbimycin und Sorbimycin bisher vorhandenen Daten und Spektren sowie deren Interpretation danken.

3.4.1. Dünnschichtchromatographie und Identifizierung

Disorbimycin und Sorbimycin wurden in verschiedenen Laufmitteln chromatographiert. Die Rf-Werte sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Rf-Werte von Disorbimycin und Sorbimycin bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 F 254

Laufmittelsysteme (v/v)	Rf-Werte Disorbimycin	Sorbimycin
Chloroform/Methanol 90/10	0,83	0,31
Chloroform/Aceton 90/10	0,32	0,06
Chloroform/Butanol 50/50	0,81	0,36
Benzol/Methanol 90/10	0,31	0,08
Benzol/Methanol/Eisessig 70/20/10	0,70	0,72
Essigester	0,81	0,13

Auf dem entwickelten Chromatogramm sind Disorbimycin und Sorbimycin mit den in Tab. 2 zusammengestellten Methoden nachzuweisen.

Tab. 2: Nachweismethoden für Disorbimycin und Sorbimycin

Nachweismethode	Disorbimycin	Sorbimycin
Tageslicht	+	+
UV-Licht 254 nm	+	+
H_2SO_4-Sprühreagens	braun	braun
$Fe(Cl)_3$-Sprühreagens	gelb-braun	gelb-braun
$Ti(Cl)_3$-Sprühreagens	gelb	gelb
Bioautogramm	+	+

3.4.2. Spektren

3.4.2.1. UV-Spektrum

Abb. 6 und 7 geben die sichtbaren und UV-Absorptionsspektren von Disorbimycin und Sorbimycin wieder.

Die Spektren von Disorbimycin in Methanol und angesäuertem Methanol zeigen nahezu identische Maxima, während der Zusatz von Natronlauge eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen bewirkt.
Das Spektrum von Sorbimycin weist in Methanol und alkalischem Methanol nahezu identische Maxima auf. Durch Säurezusatz wird eine Verschiebung der Maxima in den kürzerwelligen Bereich bewirkt.

Aufgrund dieser Spektren lassen sich über die Natur des Chromophors noch keine detaillierten Aussagen machen.

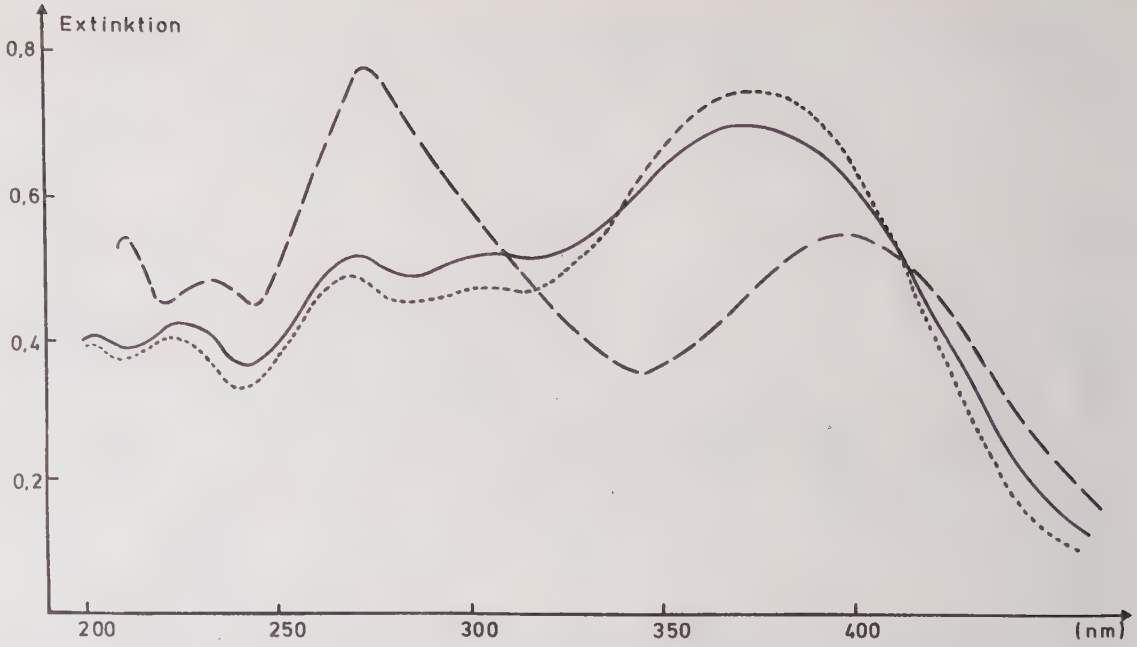


Abb. 6: UV-Spektrum von Disorbimycin

———— Methanol λ_{max} = 370; 305; 269; 226 (nm)

------- Methanol/2 N NaOH λ_{max} = 396; 272; 233 (nm)

····· Methanol/2 N HCl λ_{max} = 370; 303; 267; 224 (nm)

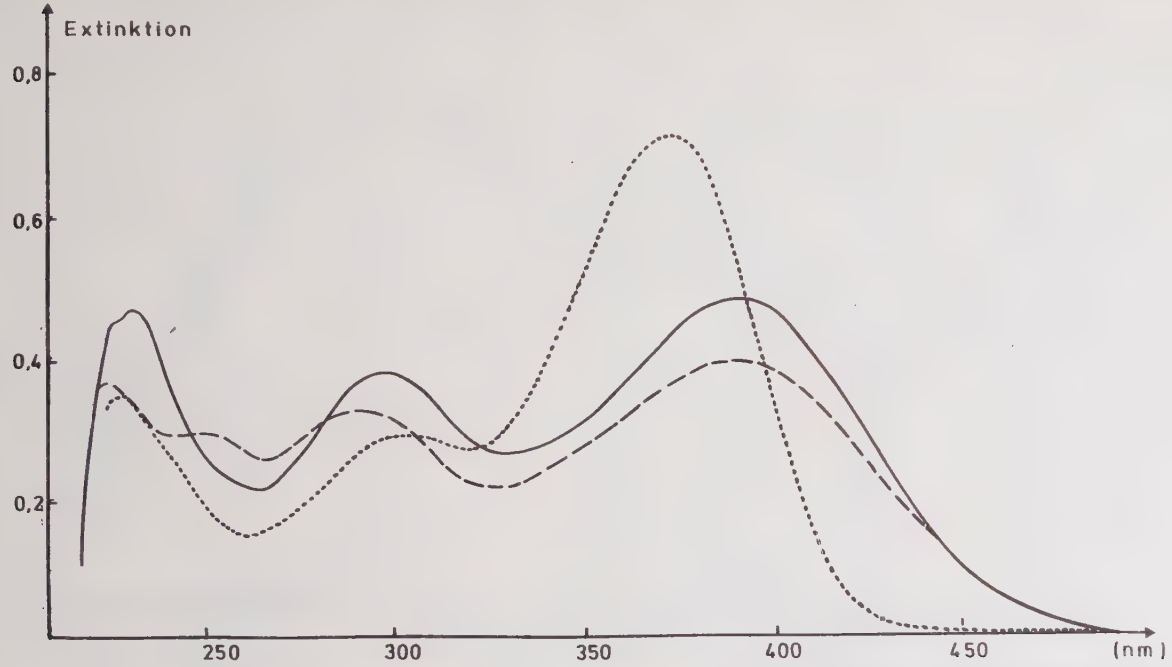


Abb. 7: UV-Spektrum von Sorbimycin

———— Methanol λ_{max} = 390; 296; 232 (nm)

------- Methanol/2 N NaOH λ_{max} = 390; 290; 250; 221 (nm)

····· Methanol/2 N HCl λ_{max} = 373; 306; 227 (nm)

3.4.2.2. IR-Spektren

Das IR-Spektrum des Antibioticums Disorbimycin ist in Abb. 8 wiedergegeben. Es ist relativ schlecht aufgelöst, sodaß sich im Carbonylbereich nur breite Banden mit mehreren Schultern zeigen. Demnach sind vermutlich mehrere C=O-Gruppen vorhanden. Die weiteren Signale sind unspezifisch.

Abb. 9 zeigt das IR-Spektrum von Sorbimycin.

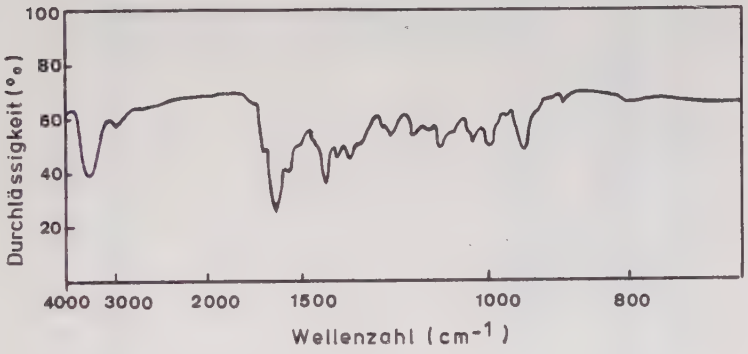


Abb. 8: IR-Spektrum von Disorbimycin

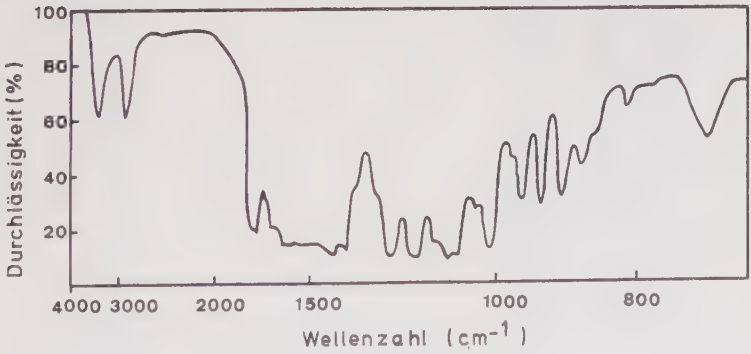


Abb. 9: IR-Spektrum von Sorbimycin

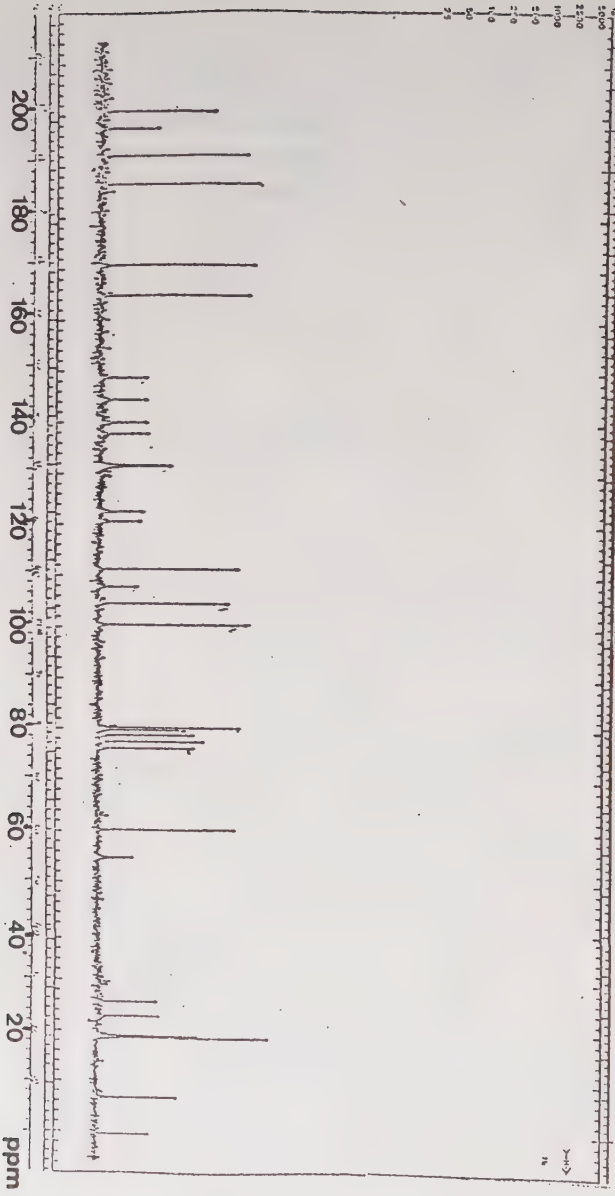


Abb. 10: ^{13}C-NMR-Spektrum von Disorbimycin

Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Sorbimycin

Tab. 3: Versuch zur Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums von Disorbimycin

ppm	Aufspaltung	Funktion
199,6	s	aliphat.Keton, evt.chel. aromat.Keton
196,2	s	aliphat.Keton, evt.chel. aromat.Keton
191,0	s	unges. Keton
185,5	s	unges. Keton
169,9	s	Ester; Enol C=C-O
164,0	s	Olefin-C
147,9	d	Olefin-C
143,7	d	Olefin-C
139,3	d	Olefin-C
137,2	d	Olefin-C
131,1	d	Olefin-C
130,9	d	Olefin-C
121,9	d	Olefin-C
120,0	d	Olefin-C
110,6	s	Olefin-C
107,2	s	Olefin-C
104,0	s	Olefin-C
99,8	s	C=C-O
79,8	s	C-O
79,3	s	C-O
59,3	s	quart. C
54,5	d	C-H; evt. mit O
25,7	q	$-CH_3$
22,9	q	$-CH_3$
19,1	q	$-CH_3$
18,9	q	$-CH_3$
7,0	q	$-CH_3$

Die Gesamtheit der im ^{13}C-NMR-Spektrum nachweisbaren Signale ergibt 28 C-Atome.

3.4.2.3. ^{13}C-NMR-Spektren

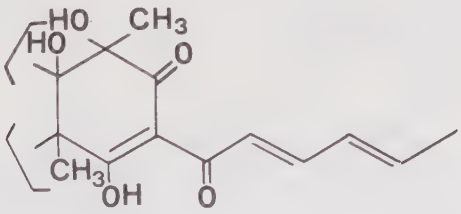
Abb. 10 und 11 zeigen die ^{13}C-NMR-Spektren von Disorbimycin und Sorbimycin, aufgenommen in deuteriertem Chloroform. Ein Versuch der Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums von Disorbimycin ist in Tab. 3 wiedergegeben.

3.4.3. Vorläufige Daten von Disorbimycin und Sorbimycin

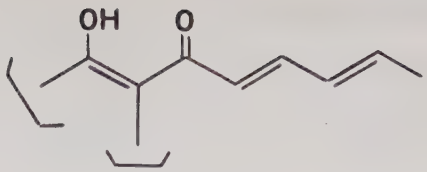
Disorbimycin ist eine gelbe, amorphe, sauerreagierende Substanz mit einem Schmelzpunkt von 124°C.
Das Antibioticum ist in Lösung relativ instabil. Basenzusatz und Lichteinfluß wirken sich auf die Zersetzung beschleunigend aus.
Durch Hydrierung der Verbindung werden 8 H-Atome aufgenommen. Bromwasser und Kaliumpermanganat werden durch Disorbimycin entfärbt. In der Elementaranalyse konnten keine Heteroatome nachgewiesen werden.
Anhand der Spektren und chemischen Untersuchungen wurde folgende Summenformel aufgestellt: $C_{28}H_{32}O_9$, was ein Molekulargewicht von 512,5 ergibt.
Der endgültige Nachweis, daß es sich bei Disorbimycin um ein Dimeres von Sorbimycin handelt, steht noch aus.

Für Disorbimycin wurden die Partialstrukturen (1) - (3) postuliert.

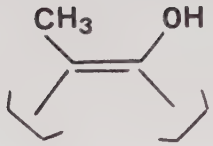
(1)



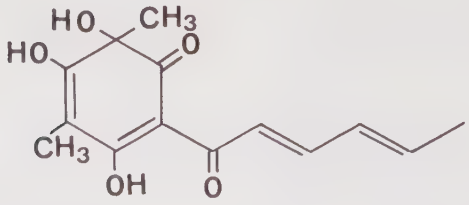
(2)



(3)



Sorbimycin, das bei einer Fermentation aufgetretene Abbauprodukt von Disorbimycin, kann durch 90minütiges Erhitzen von Disorbimycin in Xylol bei 141°C mit einer Ausbeute von 15 % synthetisiert werden.
Sorbimycin ist eine gelbe, amorphe Substanz mit einem Schmelzpunkt von 171°C. Im Gegensatz zu Disorbimycin ist diese Verbindung wasserlöslich.
Für dieses Abbauprodukt, ein Hexaketid, mit der Summenformel $C_{14}H_{16}O_5$ und einem Molekulargewicht von 264 wurde folgender Strukturvorschlag gemacht:



3.5. Biologische Charakterisierung

3.5.1. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Disorbimycinkonzentration

Die mit verschiedenen Antibioticumkonzentrationen im Plattendiffusionstest erreichbaren Hemmhofdurchmesser für Bacillus brevis und Bacillus subtilis auf chemisch definiertem und komplettem Medium sind in Abb. 12 dargestellt.

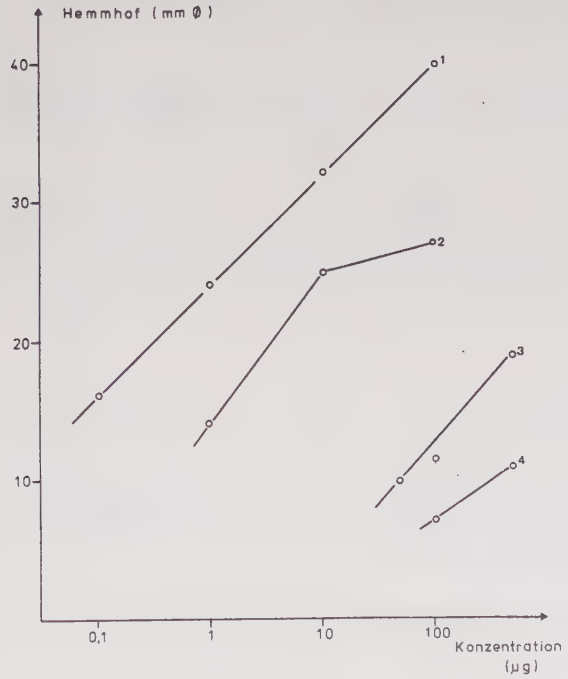


Abb. 12: Größe des Hemmhofdurchmessers in Abhängigkeit von der Disorbimycinkonzentration in µg/Testrondelle
1 Bacillus brevis auf synthetischem Medium 13
2 Bacillus brevis auf komplettem Medium 4
3 Bacillus subtilis auf synthetischem Medium 12
4 Bacillus subtilis auf komplettem Medium 4

Disorbimycin zeigt auf synthetischem Medium eine bessere Hemmwirkung als auf komplettem Nährboden. Nach Hanka (1967) kann dies auf im komplettem Medium vorhandene Substanzen zurückzuführen sein, die die Wirkung des Antibioticums antagonisieren.
Die Nachweisgrenze liegt auf komplettem Medium für Bacillus brevis um eine Zehnerpotenz, bei Bacillus subtilis um eine halbe Zehnerpotenz höher, als auf chemisch-definiertem Medium. Wie aus der Abb. 12 ersichtlich ist, besteht bei den Geraden 1, 3 und 4 ein linearer Zusammenhang zwischen Hemmhofdurchmesser und Logarithmus der Disorbimycinkonzentration. Bei einer Konzentration von 10 µg/Testrondelle nimmt jedoch die Steigung bei Bacillus brevis auf komplettem Medium ab.

Auch Sorbimycin übt auf Bacillus brevis und Bacillus subtilis eine Hemmwirkung aus. Die Nachweisgrenze liegt jedoch um ca. zwei Zehnerpotenzen höher als die von Disorbimycin.

Da Sorbimycin nur in sehr geringen Mengen präparativ zugänglich ist, konnte von dieser Substanz kein breites Wirkungsspektrum aufgenommen werden. Auch die Untersuchungen zur Wirkungsweise mußten auf Disorbimycin beschränkt bleiben.

3.5.2. Wirkungsspektrum

Im Plattendiffusionstest und teilweise im Verdünnungsreihentest wurde die Empfindlichkeit verschiedener Bakterien und Pilze auf Disorbimycin getestet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Minimale Hemmkonzentration von Disorbimycin bei verschiedenen Bakterien und Pilzen im Plattendiffusionstest

Test in der Verdünnungsreihe durchgeführt x (vgl. 2.6.2.)
Test an der Riesenkolonie durchgeführt o (vgl. 2.6.1.2.)

Organismen	Inkubationstemp. (°C)	Medium	Testmethode	MHK[1)]
Bakterien:				
Pseudomonadales:				
Pseudomonas fluorescens	27	12		> 50
Pseudomonas saccharophila	37	1		> 50
Eubacteriales:				
Achromobacter geminiani	27	12		> 50
Agrobacterium tumefaciens	27	12	x	10- 50
Arthrobacter pascens	27	1		> 50
Bacillus brevis	37	16	x	<0,1
Bacillus cereus	30	12	x	>100
Bacillus subtilis	37	12	x	10-50
Clostridium pasteurianum	30	6		> 50
Corynebacterium poinsettiae	27	12		> 50
Corynebacterium rathayi	37	12	x	10-100
Corynebacterium spec.	37	12	x	>100
Escherichia coli A 19/15	37	3		>100
Escherichia coli B	37	12		> 50
Escherichia coli D 22	37	3		>100
Escherichia coli K 12	37	12		> 50
Halobacterium cutirubrum	37	7		10- 50
Micrococcus luteus	27	12	x	10-100
Micrococcus roseus	27	12	x	>100
Proteus vulgaris	37	12	x	10- 50
Salmonella typhimurium	37	12		> 50
Serratia marcescens	27	12		> 50

Organismen	Inkubationstemp. (°C)	Medium	Testmethode	MHK[1)]
Staphylococcus aureus	37	1	x	>100
Streptococcus faecalis	37	1		> 50
Actinomycetales:				
Streptomyces antibioticus	37	1		10- 50
Streptomyces cellulosae	37	12		10- 50
Streptomyces violaceus-niger	37	1		10
Streptomyces viridochromogenes	37	1		1- 10
Pilze:				
Zygomycetes:				
Mucor hiemalis (-/+)	27	1		> 50
Mucor miehei	37	1		> 50
Ascomycetes und zugehörige Deuteromycetes:				
Ascoidea rubescens	37	2		50
Candida albicans	27	1		> 50
Eurotium cristatum	24	8		> 50
Saccharomyces cerevisiae	27	2		> 50
Schizosaccharomyces pombe (-)	27	1		50
Alternaria kikuchiana	27	9		> 50
Aspergillus deflectus	27	1		> 50
Aspergillus panamensis	27	1		> 50
Botrytis cinerea	24	2	o	> 50
Curvularia spec.	27	1		50
Microsporum gypseum	27	1		> 50
Paecilomyces varioti	37	2		50

[1)] Konzentrationen: µg/Testrondelle im Plattendiffusionstest entsprechen µg/ml im Verdünnungsreihentest.

Die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen im Verdünnungsreihentest stimmten mit den im Plattendiffusionstest erhaltenen Werten überein.

Disorbimycin zeigt in relativ hohen Konzentrationen Hemmwirkung auf einige wenige gram + Bakterien. Die Organismengruppe der Streptomyceten wird zwischen 10 und 50 µg/Testrondelle gehemmt. Bacillus brevis zeigt sich mit einer MHK unter 0,1 µg/ml als eindeutig empfindlichster Organismus.

Gram - Bakterien erfahren durch Disorbimycin keine Wachstumshemmung. Auch Escherichia coli A 19/15 und Escherichia coli D 22, die stark permeationsbeschädigte Membranen besitzen, konnten mit einer Konzentration von 100 µg/Testrondelle nicht gehemmt werden.

Pilze zeigen sich gegen Disorbimycin unempfindlich.

3.5.3. Wachstumskurven unter dem Einfluß von Disorbimycin

In den Abb. 13-15 ist die Wirkung von Disorbimycin auf verschiedene Wachstumsphasen von Bacillus brevis und Bacillus subtilis dargestellt.

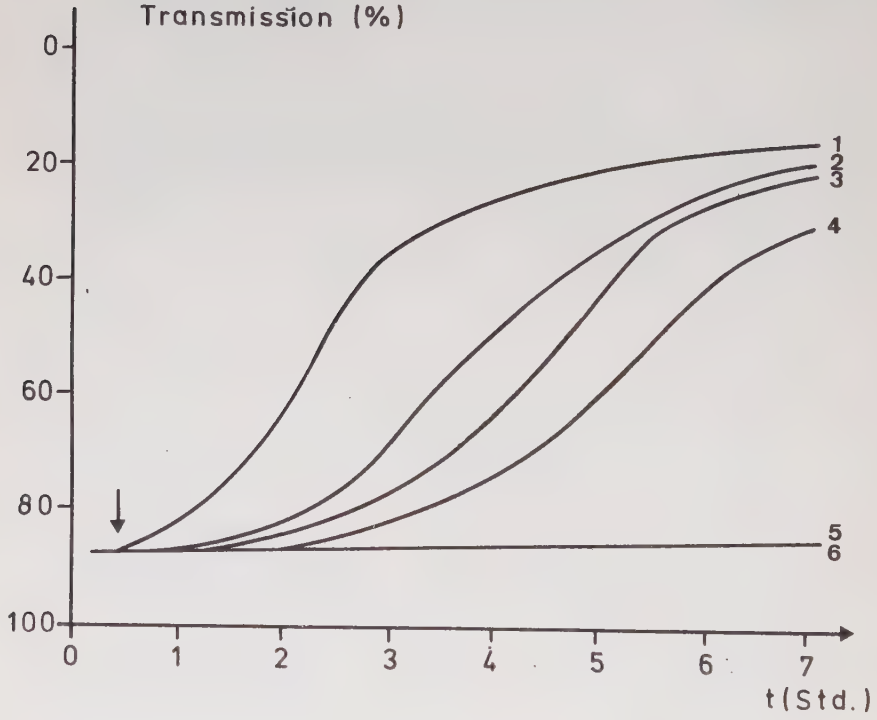


Abb. 13: Einfluß von Disorbimycin auf das Wachstum von Bacillus brevis in Medium 16.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Disorbimycinzugabe.

1 Kontrolle
2 0,1 µg/ml Disorbimycin
3 1,0 µg/ml Disorbimycin
4 10 µg/ml Disorbimycin
5 50 µg/ml Disorbimycin
6 100 µg/ml Disorbimycin

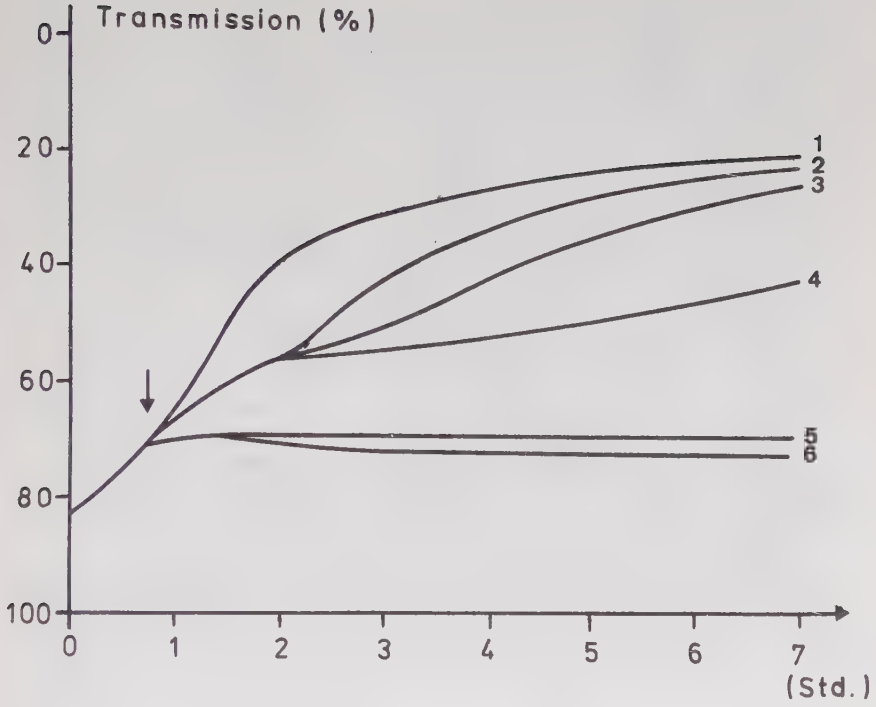


Abb. 14: Einfluß von Disorbimycin auf das Wachstum von Bacillus brevis in Medium 16.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Disorbimycin-zugabe.

1 Kontrolle
2 0,1 µg/ml Disorbimycin
3 1,0 µg/ml Disorbimycin
4 10 µg/ml Disorbimycin
5 50 µg/ml Disorbimycin
6 100 µg/ml Disorbimycin

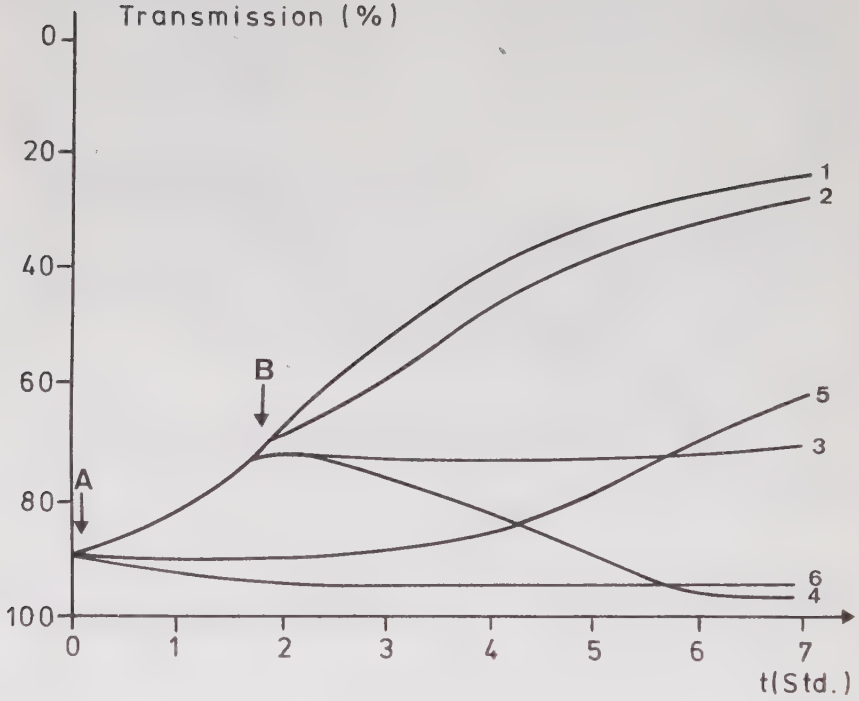


Abb. 15: Einfluß von Disorbimycin auf das Wachstum von Bacillus subtilis in Medium 12.
Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Disorbimycin-zugabe.
Die Wachstumskurven mehrerer Biophotometerversuche wurden umgezeichnet.

1 Kontrolle
2 10 µg/ml Disorbimycin (B)
3 50 µg/ml Disorbimycin (B)
4 100 µg/ml Disorbimycin (B)
5 50 µg/ml Disorbimycin (A)
6 100 µg/ml Disorbimycin (A)

Disorbimycin übt auf das Wachstum von Bacillus brevis in synthetischem Medium in der lag- und der log-Phase in einer Konzentration von 0,1 µg/ml eine gute Hemmwirkung aus. Dieses Ergebnis entspricht dem im Verdünnungsreihentest ermittelten Wert.

Sofort nach Zugabe des Antibioticums tritt in beiden Wachstumsphasen eine Hemmwirkung auf. Bei geringen Disorbimycinkonzentrationen findet nur eine kurze Phase der Hemmung und dann eine Wachstumsverzögerung statt.

Nach der Antibioticumbehandlung wurden die Bacillus brevis-Zellen auf frischem Medium ausplattiert. Sämtliche Zellen, denen weniger als 100 µg/ml zugesetzt worden war, konnten weiterwachsen. Die Wirkung von Disorbimycin ist also in diesen Konzentrationen reversibel - das Antibioticum wirkt bakteriostatisch. In einer Konzentration von 100 µg/ml wirkt Disorbimycin bakterizid.

Die Zugabe des Antibioticums zu Bacillus subtilis-Zellen in einer Konzentration von 10 µg/ml bewirkte in der log- und in der lag-Phase (letztere ist nicht aufgezeichnet) eine Wachstumsverzögerung. Der MHK-Wert liegt im Biophotometer etwas niedriger als im Plattendiffusionstest und in der Verdünnungsreihe. Dies mag daran liegen, daß in den beiden letztgenannten Testmethoden Wachstumsverzögerungen nicht erfaßt werden können.

Die minimale bakteriostatische Hemmkonzentration liegt für Bacillus subtilis in beiden Wachstumsphasen bei 50 µg/ml. Wie aus der Abb. 15 deutlich hervorgeht, wirkt eine Zugabe von 100 µg/ml Disorbimycin in der logarithmischen Phase lysierend auf die Zellen. Ein schwacher lysierender Effekt tritt auch bei Zusatz dieser Konzentration in der lag-Phase ein, jedoch kommt es hier nach 17 Stunden wieder zu einem minimalen Wachstum. Es konnte festgestellt werden, daß es sich hierbei um resistente Zellen handelt.

Die beschriebenen Wirkungen von Disorbimycin auf Bacillus

subtilis-Zellen im Biophotometer waren häufig nicht zu reproduzieren. Eine Ursache hierfür könnte die Labilität des Antibioticums sein, die mit einer Abnahme der Hemmwirkung einhergeht.

3.6. Versuche zur Wirkungsweise von Disorbimycin

3.6.1. Antagonisten von Disorbimycin im Kreuztest

Antagonisten eines Antibioticums lassen häufig Rückschlüsse auf den Wirkort zu (Pache & Zähner, 1969). So können beispielsweise aus Lipidextrakten empfindlicher Organismen isolierte Substanzen Bindungsstellen für Antibiotica darstellen (Halder & Bose, 1971).

Es wurde daher versucht, Substanzen mit antagonisierender Wirkung auf Disorbimycin zu finden. In Tab. 5 sind die Ergebnisse mit einigen im Kreuztest geprüften Substanzen aufgeführt.

Zusätzlich untersuchte biogene Aminosäuren bewirkten keine Aufhebung der Hemmwirkung von Disorbimycin.

Das Antibioticum wird unter anderem durch Hefeextrakt, Malzextrakt und Pepton antagonisiert. Diese Substanzen stellen Bestandteile der kompletten Medien dar und sind als Ursache für die schwächere Hemmwirkung von Disorbimycin auf komplettem Medium im Vergleich zum chemisch-definierten Nährboden anzusehen (vgl. 3.5.1.).

Tab. 5: Aufhebung der Hemmwirkung von Disorbimycin (5 mg/ml) durch verschiedene Präparate im Kreuztest mit Bacillus subtilis auf Medium 12.

Präparate	Konzentration der Lösung (mg/ml)	Aufhebung
Hefeextrakt	1	+
Malzextrakt	10	+
Pepton	10	+
Casamino acids	10	+
Serum Albumin	1:10 verd.	+
Albumin	1	-
Eigelb	1:10 verd.	+
L-Alanin	1	(+)
L-Arginin	1	(+)
L-Asparagin	1	(+)
L-Asparaginsäure	1	(+)
L-Prolin	1	(+)

Erklärung: - keine A.; (+) schwache A.; + gute Antagonisierung

3.6.2. Wirkung von Disorbimycin auf Escherichia coli-Protoplasten

Der Einfluß von Disorbimycin auf die Protoplasten von Escherichia coli wurde durch Messen der Extinktion im Eppendorf Photometer bei 578 nm verfolgt.

Innerhalb einer Stunde erfolgte keine Abnahme der Extinktion. Die Cytoplasmamembran kann daher als primärer Wirkort von Disorbimycin ausgeschlossen werden.

3.6.3. DNA-, RNA- und Proteinsynthese in vivo

Für viele Antibiotica liegt der primäre Wirkort im Bereich der Makromolekülsynthesen oder der Zellmembranfunktion (Gale et al., 1972).

Die Wirkung von Disorbimycin auf die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in vivo bei Bacillus subtilis wurde mit Hilfe des Einbaus radioaktiv markierter Vorstufen in säurefällbares Material der Zellen untersucht und ist in Abb. 16-18 wiedergegeben.

Zum Vergleich wurde Actinomycin C_3, Chloramphenicol und Rifamycin getestet. Actinomycin interkaliert mit der DNA (Kirk, 1960), Rifamycin wirkt auf die RNA-Synthese (Hartmann et al., 1967) und Chloramphenicol auf die Proteinsynthese (Pongs, 1979) der Prokaryonten.

Der Einbau von (^{14}C)Thymidin in Bacillus subtilus wurde von Disorbimycin nicht gehemmt.

Die RNA-Synthese ist nach 60 Minuten durch Disorbimycin in einer Konzentration von 100 µg/ml um 74 %, in einer Konzentration von 10 µg/ml nur um 7 % und durch Rifamycin um 82 % gehemmt. Sofort nach Zugabe des Antibioticums wurde der Einbau von (^{14}C)Uracil gehemmt.

Wie Abb. 18 zeigt, wird durch Disorbimycin auch der Einbau von (^{14}C)Isoleucin gehemmt. Die Proteinbiosynthese ist nach 60 Minuten durch Disorbimycin in einer Konzentration von 100 µg/ml um 64 %, in einer Konzentration von 10 µg/ml um 19 % und durch Chloramphenicol um 81 % gehemmt. Bei der Proteinsynthese tritt eine Hemmung durch Disorbimycin erst 5 Minuten nach Zugabe des Antibioticums ein.

Um die RNA- und Proteinsynthese zu hemmen, bedarf es einer relativ hohen Konzentration des Antibioticums Disorbimycin.

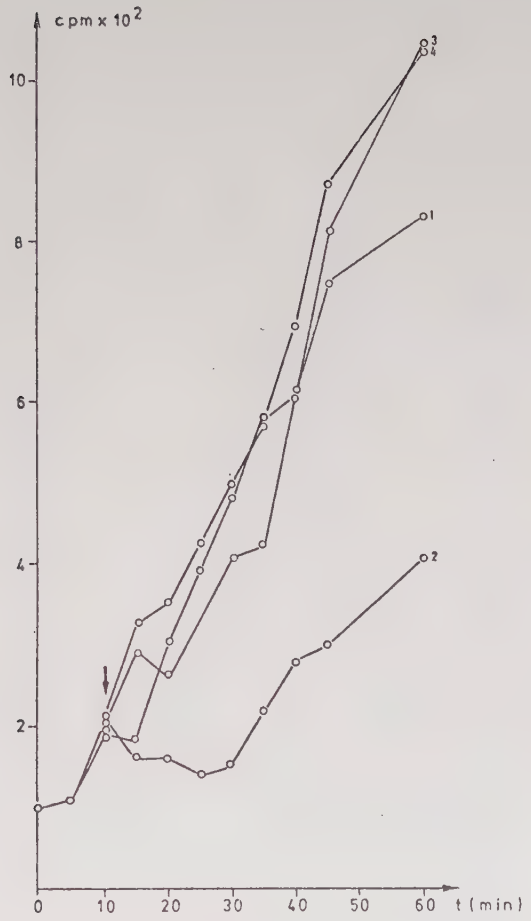


Abb. 16: Einbau von (^{14}C)Thymidin in Zellen von Bacillus subtilis nach Zugabe von Disorbimycin.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticum-zugabe.

1 Kontrolle
2 0,5 µg/ml Actinomycin C_3
3 100 µg/ml Disorbimycin
4 10 µg/ml Disorbimycin

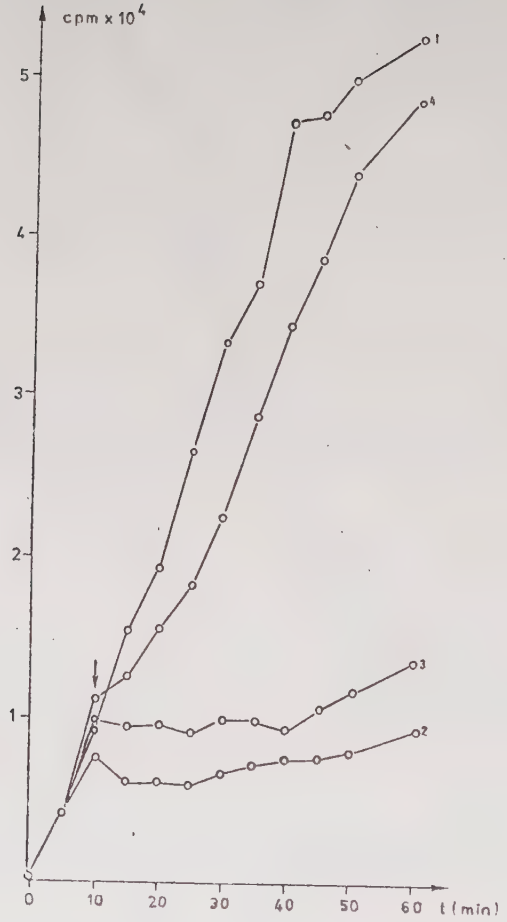


Abb. 17: Einbau von (^{14}C)Uracil in Zellen von Bacillus subtilis nach Zugabe von Disorbimycin.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticum-zugabe.

1 Kontrolle
2 1 µg/ml Rifamycin
3 100 µg/ml Disorbimycin
4 10 µg/ml Disorbimycin

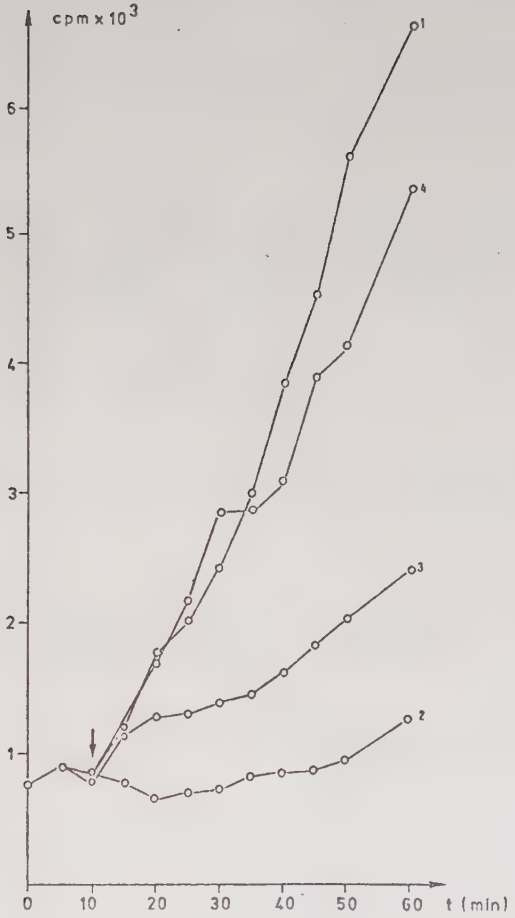


Abb. 18: Einbau von (^{14}C)Isoleucin in Zellen von Bacillus subtilis nach Zugabe von Disorbimycin.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticum-zugabe.

1 Kontrolle
2 60 µg/ml Chloramphenicol
3 100 µg/ml Disorbimycin
4 10 µg/ml Disorbimycin

3.6.4. Wirkung von Disorbimycin auf die RNA-Synthese in vitro

Da aufgrund einer Hemmwirkung in vivo sehr schwer zwischen einer primären und sekundären Hemmwirkung unterschieden werden kann, wurde der Einfluß von Disorbimycin auf die RNA-Polymerase in vitro untersucht.

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase synthetisiert aus den Ribonucleosid-Triphosphaten ATP, CTP, GTP und UTP unter Abspaltung von Pyrophosphat RNA-Moleküle nach den Gesetzen der Basenpaarung (Knippers, 1971). Die RNA-Synthese in vitro kann durch den Einbau eines radioaktiv markierten Nucleotids in säurefällbares Material verfolgt werden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Wirkung von Disorbimycin auf die DNA abhängige RNA-Polymerase in vitro

Testansatz	Impulse/Minute	Einbaurate (%)
Kontrolle + 10 µl Aceton	39 241	100
+ 1 µg/ml Disorbimycin	51 793	132
+ 10 µg/ml Disorbimycin	58 362	149
+ 100 µg/ml Disorbimycin	28 033	71
+ 5 µg/ml Rifamycin	9 167	23

Disorbimycin in geringen Konzentrationen scheint einen stimulierenden Effekt auf die RNA-Synthese auszuüben. In einer Konzentration von 100 µg/ml bewirkt das Antibioticum eine

29 %ige Hemmung. Der als Referenzsubstanz getestete RNA-Polymerase-Hemmstoff Rifamycin (Wehrli & Staehlin, 1975) ergab eine Hemmung von 77 %.

3.6.5. Interaktionen mit DNA

Eine Hemmung der RNA-Synthese kann auf Wechselwirkungen eines Antibioticums mit der DNA zurückzuführen sein. Bei Swanbeck (1966) sind solche Interaktionen für einige Anthraceen- und Anthrachinonderivate beschrieben.

Disorbimycin zeigte selbst nach 24 Stunden Inkubation keine Wechselwirkungen mit der DNA. Auch der Zusatz von Magnesiumionen nach Ueno et al. (1968) bewirkte keine Verschiebung des Absorptionsmaximums von Disorbimycin in den längerwelligen Bereich.

3.6.6. RNA-Synthese unter Einfluß von Chloramphenicol und Disorbimycin in vivo

Disorbimycin hemmt die RNA- und Proteinsynthese (vgl. 3.6.3.) in Bacillus subtilis-Zellen. Die RNA-Synthese konnte aufgrund der in vitro Versuche (vgl. 3.6.4. und 3.6.5.) als primärer Wirkort von Disorbimycin ausgeschlossen werden. In dem folgenden Versuch sollte der Einfluß des Antibioticums auf die Proteinsynthese genauer untersucht werden.

Wird die Proteinsynthese durch Antibiotica gehemmt, deren Wirkort im ribosomalen Bereich liegt, wie dies zum Beispiel bei Chloramphenicol der Fall ist, so wird die RNA-Synthese dadurch nicht beeinflußt (Edlin & Broda, 1968; Cashel, 1969). Ferner läuft bei mit einer Aminosäure ausgehungerten Zellen nach Zugabe von Chloramphenicol die RNA-Synthese weiter. Chloramphenicol unterbindet also die stringent control der

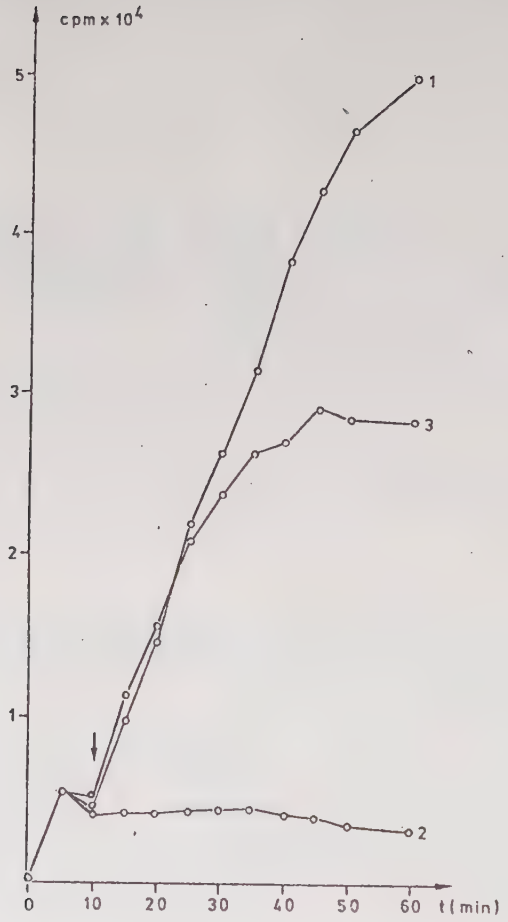


Abb. 19: Einbau von (^{14}C)Uracil in Zellen von Bacillus subtilis nach Zugabe von Disorbimycin und Chloramphenicol.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe.

1 Kontrolle
2 100 µg/ml Disorbimycin
3 100 µg/ml Disorbimycin + 60 µg/ml Chloramphenicol

RNA-Synthese (Edlin & Broda, 1968; Cashel, 1969; Lund & Kjelgaard, 1972).

Abb. 19 zeigt, daß im Gegensatz zur sofortigen Hemmung der RNA-Synthese durch Disorbimycin bei gleichzeitiger Zugabe von Chloramphenicol und Disorbimycin die RNA-Synthese weiterläuft. Nach 20 Minuten tritt jedoch auch hier eine geringe Hemmung der RNA-Synthese ein, was aber nach dieser Zeit eine Folgeerscheinung der Hemmung der Proteinsynthese sein könnte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das Antibioticum Disorbimycin primär die Proteinsynthese hemmt, was ohne Zusatz von Chloramphenicol eine Hemmung der RNA-Synthese zur Folge hat.

3.6.7. RNA-Synthese in Bacillus subtilis BR 16 RC^{str} und Bacillus subtilis BR 16 RC^{rel} unter Einfluß von Disorbimycin

Bakterien, die auf die externe Zufuhr einer oder mehrerer Aminosäuren angewiesen sind, antworten auf Wachstumsbedingungen, bei denen die Aminosäuren nicht mehr verfügbar sind, mit verschiedenen Reaktionen. Der Effektor für diese von der Aminosäure-Aushungerung betroffenen Zellvorgänge ist das Genprodukt des RNA control (RC) oder Rel A Locus (Edlin & Broda, 1968; Watson, 1976). Dieses Genprodukt bestimmt normalerweise den stringent control Mechanismus in Bakterienzellen (Stent & Brenner, 1961; Ryan & Borek, 1971). Erfolgt Mutation an diesem Genprodukt, so läuft bei den entstandenen Mutanten die RNA-Synthese im Gegensatz zum Wildtyp bei gestoppter Proteinsynthese weiter.
Mit diesen Mutanten sollte untersucht werden, ob Disorbimycin primär die Proteinsynthese hemmt.

In Abb. 20 ist die Wirkung von Disorbimycin auf Bacillus subtilis BR 16 RC^{str} und Bacillus subtilis BR 16 RC^{rel} abgebildet. Das Antibioticum zeigt sowohl Hemmwirkung auf die

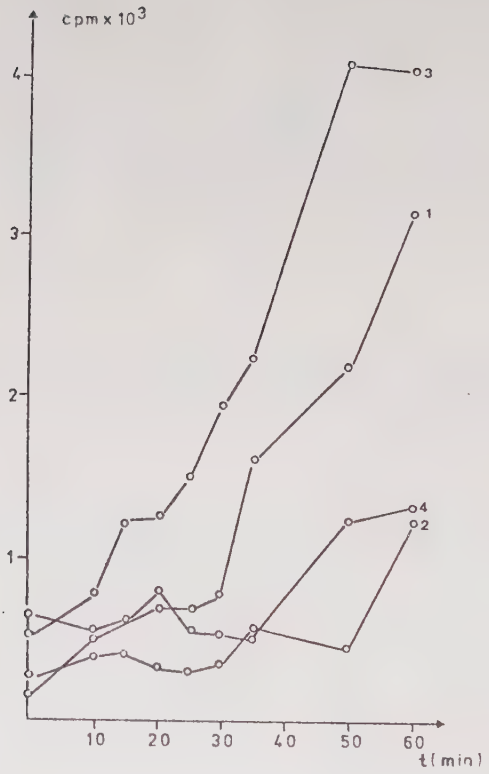


Abb. 20: Einbau von (^{14}C)Uracil in Zellen von Bacillus subtilis BR 16 RC^{rel} und RC^{str} nach Zugabe von Disorbimycin.
Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Antibioticumzugabe.

1 Kontrolle B. subtilis BR 16 RC^{str}
2 B. subtilis BR 16 RC^{str} + 100 µg/ml Disorbimycin
3 Kontrolle B. subtilis BR 16 RC^{rel}
4 B. subtilis BR 16 RC^{rel} + 100 µg/ml Disorbimycin

Zellen, die dem stringent control Mechanismus unterliegen, als auch auf die relaxed Mutante.

Zu Vergleichszwecken wurde Ochratoxin A herangezogen, dessen primärer Wirkort die Proteinsynthese darstellt (Heller et al., 1975). Wie zu erwarten war, lief unter Einfluß von Ochratoxin A die RNA-Synthese bei der relaxed Mutante weiter, während sie beim Wildtyp gehemmt wurde.

3.6.8. Einfluß von Disorbimycin auf die Proteinsynthese in vitro

Das verwendete Testsystem Poly(U) abhängige Poly(Phe)-Synthese hat sich bereits häufig bei Untersuchungen zur Wirkungsweise von Antibotica bewährt (Wolf et al., 1972). Das Poly(U)-System erfaßt jedoch nur die Elongationsphase der Proteinsynthese, Initiations- und Terminationsphase laufen unspezifisch ab.
Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7: Einfluß von Disorbimycin auf die Poly(Phe)-Synthese im zellfreien System von Escherichia coli.

	Disorbimycin			
	Kontrolle	50 µg/ml	500 µg/ml	2500 µg/ml
Impulse pro Minute	10 890	11 980	12 402	15 481

Disorbimycin zeigt auch in hohen Konzentrationen keine Wirkung auf dieses Testsystem. Eine Erhöhung der Antibioticum-

konzentration bewirkt eine Stimulation der Poly(Phe)-Synthese. Im Gegensatz zu Kirromycin, das in einer Konzentration von 3,5 µg/ml die Proteinsynthese um 97 % vermindert (Wolf, 1971), kann Disorbimycin kein spezifischer Hemmstoff dieser Proteinsynthese sein, wobei jedoch berücksichtigt werden muß, daß die Synthese von Poly(Phe) nicht allgemein stellvertretend für Proteinsynthese stehen darf.

3.6.9. Beladung der t-RNA in vitro

Die Beladung der t-RNA ist von entscheidender Bedeutung für einen fehlerfreien Ablauf der Proteinsynthese. Nach Söll und Schimmel (1974) verändert, läuft die Reaktion in folgenden Teilschritten ab: Aktivierungsschritt (1) und Transferreaktion (2).

$$AS + ATP + Enzym \longrightarrow Enzym\text{-}AS\text{-}AMP + pp_i \qquad (1)$$

$$Enzym\text{-}AS\text{-}AMP + t\text{-}RNA \longrightarrow AS\text{-}t\text{-}RNA + AMP + Enzym \qquad (2)$$

Das Enzym Aminoacyl-t-RNA-Synthetase kann unter anderem nach Old & Jones (1976 a, b; 1977) durch Aminosäureantagonisten gehemmt werden. Neben vielen anderen Antibiotica stellt z.B. das Makrolid Borrelidin einen Inhibitor dieses Enzyms dar (Poralla & Zähner, 1968). Borrelidin hemmt die Beladung der t-RNA mit Threonin, und im Kreuztest erfolgt eine Aufhebung der Hemmwirkung dieses Antibioticums durch diese Aminosäure. In diesem Versuch sollte nun untersucht werden, ob die Beladung der t-RNA mit einer der im Kreuztest antagonisierenden Aminosäuren (vgl. 3.6.1.) gehemmt wird.

Disorbimycin bewirkte keine Hemmung der Beladung der t-RNA mit den Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin und Prolin.

3.6.10. Messung an künstlichen Membranen - Liposomenversuche

Die Verwendung von Liposomen geht zurück auf Bangham et al. (1965), die diese Lipidvesikel erstmals zu Diffusionsstudien mit Ionen benutzten und erkannten, daß die Diffusion an Liposomen der Diffusion an biologischen Membranen ähnlich ist.

Das Antibioticum zeigte keinen Einfluß auf die Liposomen.

3.6.11. Test auf Toxizität bei NS-1 Tumorzellen

Die verwendeten Tumorzellen entstammen der Zellinie NS-1, einer Variante von P3, und sind mineralölinduzierte Plastocytome von Mäusen (Komischke, 1980).

Im Gegensatz zu Actinomycin wurde durch Disorbimycin keine Senkung der Lebendzellzahl bei NS-1 Tumorzellen bewirkt.

3.6.12. Test auf Toxizität bei höheren Organismen

Dinophilus gyrociliatus konnte eine Konzentration von 50 µg/ml gut über 8 Tage vertragen. Auch eine Wirkung gegen Eucoccidium dinophili konnte nicht festgestellt werden.

Disorbimycin zeigte in diesem Versuch keine toxische Wirkung und auch keinen Einfluß auf Parasiten.

4. D I S K U S S I O N

4.1. Fermentation

Der Produzentenstamm Penicillium chrysogenum Thom wurde zur Herstellung von größeren Mengen Disorbimycin im 10, 25 und 200 l Fermenter angezogen. Das Fermentationssystem mit Intensor wurde dem mit Blattrührer vorgezogen, da im Umwurfsystem höhere Ausbeuten erzielt werden konnten und der optimale Erntezeitpunkt früher erreicht war.

Wie aus den Abb. 1-4 hervorgeht, tritt jedoch bei allen Fermentationen nur ein sehr enges Produktionsmaximum auf. Nach Erreichen des höchsten Antibioticumgehaltes fällt die Disorbimycinkonzentration relativ rasch wieder ab. Zur weiteren Verbesserung der Fermentationen wäre es daher sicher sehr nützlich zu versuchen, das Maximum der Disorbimycinkonzentration über einen etwas längeren Zeitraum zu erhalten. Eine Möglichkeit hierfür bestünde in pH-statischem Weiterfahren der Fermentation nach Erreichen des Produktionsmaximums. Dieses Ziel könnte auch erreicht werden, wenn nach kurzem, freiem Verlauf des pH zur Produktion der Biomasse ein pH-shift auf den Produktions-pH durchgeführt würde und die Fermentation anschließend pH-statisch weitergefahren werden würde (Wehrle, 1980).

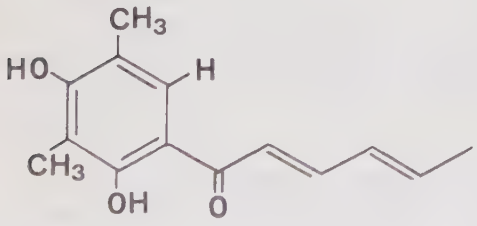
Weitere Verbesserungen der Fermentation scheinen aufgrund der zufriedenstellenden Ausbeute an Disorbimycin in den beschriebenen Systemen nicht erforderlich zu sein.

4.2. Gegenüberstellung von Disorbimycin und Sorbimycin mit Sorbicillin

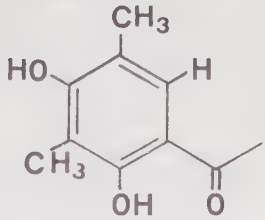
Sorbimycin, das Abbauprodukt des Antibioticums Disorbimycin, zeigt deutliche strukturelle Ähnlichkeit mit Sorbicillin, einem Pigment, das nach Cram & Tishler (1948) aus einer Probe von klinischem Penicillin neben den Pigmenten β-Penetrin und Penetrinsäure und sechs weiteren Komponenten isoliert wurde.

Das Pigment Sorbicillin wird von Penicillium notatum Westling synthetisiert. Dieser Penicillium-Stamm stellt zusammen mit Penicillium chrysogenum Thom, dem Produzentenstamm des Antibioticums Disorbimycin, Penicillium meleagrinum Biourge und Penicillium cyaneo-fulvum Biourge in der Einteilung der Schimmelpilze nach Raper & Thom (1968) eine Gruppe dar, die neben vielen morphologischen Charakteristika auch durch die Bildung und Absonderung von gelben Pigmenten gekennzeichnet ist.

Sorbicillin, dessen Struktur von Cram (1948) aufgeklärt wurde, ist ebenso wie Sorbimycin in die Gruppe der Hexaketide einzureihen und unterscheidet sich von anderen Hexaketiden durch seine Art der Cyclisierung (Turner, 1971). Strukturell zeigt Sorbicillin Ähnlichkeit mit Clavatol, einem Tetraketid, das aus Aspergillus clavatus isoliert wurde (Bergel et al., 1944; Hassal & Todd, 1947).



Sorbicillin



Clavatol

Sorbicillin ist eine polymorphe, gelb bis orange Verbindung mit der Summenformel $C_{14}H_{16}O_3$. Die chemische Synthese dieser Substanz ist bei McOmie & Tute (1958) beschrieben. Sorbicillin ist eine einbasische Säure, die im Gegensatz zu Sorbimycin in Wasser unlöslich ist, aber in Natronlauge gut in Lösung gebracht werden kann. Mit Eisen-III-chlorid färbt sich die Substanz schwarz. Bei Sorbimycin bewirkt dieses Reagens gelb-braune Färbung.

Sorbicillin ist bei Cram & Tishler (1948) ebenso wie die Pigmente ß-Penetrin und Penetrinsäure als mikrobiologisch inaktiv beschrieben. Eine Angabe über die Durchführung der Untersuchung auf biologische Aktivität fehlt.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der angeführten Hexaketide wäre jedoch ebenso wie für Sorbimycin und Disorbimycin auch für Sorbicillin eine antibiotische Aktivität zu erwarten gewesen.

Berücksichtigt man die Tatsache, daß außer für Bacillus brevis von Disorbimycin und besonders von Sorbimycin relativ hohe Konzentrationen eingesetzt werden müssen, um auf chemisch-definiertem Medium auf gram + Bakterien eine gute Hemmwirkung zu erzielen, so ist es durchaus denkbar, daß mit den im Jahre 1948 angewandten klassischen Testmethoden, die zum Beispiel im Plattendiffusionstest mit Escherichia coli auf Komplettmedium bestanden, die antibiotische Wirksamkeit nicht erkannt wurde.

Nachdem die Stämme Penicillium chrysogenum und Penicillium notatum schon seit 50 Jahren intensiv untersucht werden, ist es erstaunlich, daß sowohl Disorbimycin als auch Sorbimycin bis heute weder als Pigmente noch als Antibiotica beschrieben wurden.

Offen bleibt in diesem Zusammenhang die Frage, ob es sich bei Disorbimycin und Sorbimycin um Substanzen handelt, die in der Gruppe von Penicillium chrysogenum und Penicillium notatum verbreitet sind.

4.3. Überlegungen zum Wirkort

Einbauversuche in Bacillus subtilis-Zellen ergaben, daß durch Disorbimycin die RNA- und die Proteinsynthese gehemmt werden kann. Während die RNA-Synthese sofort nach Zugabe des Antibioticums gehemmt wird, tritt bei der Proteinsynthese die Hemmwirkung erst nach 5 Minuten ein.

Die RNA-Synthese in vitro wird durch geringe Konzentrationen an Disorbimycin stimuliert, während eine Konzentration von 100 µg/ml eine im Vergleich zum RNA-Polymerase-Hemmstoff Rifamycin relativ schwache Hemmung bewirkt.

Nachdem auch Interaktionen mit DNA ausgeschlossen werden konnten, wurde vermutet, daß Disorbimycin nicht zu denjenigen Antibiotica gerechnet werden kann, deren primären Angriffsort die RNA-Synthese darstellt.

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß die Durchführung der RNA-Synthese in vitro mit einem System aus Escherichia coli erfolgte, da dieses System am besten untersucht ist. Da aber Bacillus brevis den eindeutig empfindlichsten Organismus für Disorbimycin darstellt, hätte die Anwendung eines Systems aus Bacillus brevis eventuell ein aussagekräftigeres Ergebnis bewirkt.

Außerdem wurde bei der Untersuchung der RNA-Synthese in vitro im Vergleich zum Versuch in vivo die fünffache Konzentration des Vergleichsantibioticums Rifamycin eingesetzt, während die Konzentration an Disorbimycin konstant gehalten wurde.
Berücksichtigt man diese Konzentrationsunterschiede, so kann eine Hemmung der RNA-Polymerase nicht mehr völlig ausgeschlossen werden.

Die Proteinsynthese in vitro wurde durch Disorbimycin nicht gehemmt. Aufgrund dieses Versuches kann aber nicht grundsätzlich die Proteinsynthese als primärer Wirkort ausgeschlossen werden, da die durch Poly(U) stimulierte Poly(Phe)-

Synthese nur die Elongationsphase der Translation, aber nicht Initiation und Termination erfaßt und nicht allgemein stellvertretend für Proteinsynthese stehen darf.

Einbauversuche mit Bacillus subtilis BR 16 RC^{str} und RC^{rel} ergaben eine eindeutige Hemmung der RNA-Synthese in der dem stringent control Mechanismus unterliegenden und der relaxed Mutante. Dieses Ergebnis unterstützt stark die Vermutung, daß der primäre Angriffsort für Disorbimycin in der RNA-Synthese liegt.

Als Widerspruch hierzu ist jedoch die Tatsache anzusehen, daß die RNA-Synthese in vivo unter gleichzeitiger Zugabe von Chloramphenicol durch Disorbimycin nicht gehemmt wird.

Nachdem eine Inaktivierung von Disorbimycin durch Komplexbildung mit Chloramphenicol als Erklärung für dieses Versuchsergebnis spektroskopisch ausgeschlossen werden konnte, bleibt als Ursache nur noch eine durch Chloramphenicol verhinderte Anreicherung von Disorbimycin in der Zelle (Heller, 1980), wie sie schon für Streptomycin unter Zusatz von Chloramphenicol von Höltje (1979) beschrieben wurde.

Die Aufnahme des Aminoglycosidantibioticums Streptomycin erfolgt in zwei Phasen. Der Energie-unabhängigen ionogenen Bindung an die Zellwand mit niedriger Aufnahmerate folgt eine Energie-abhängige Anreicherung in der Zelle mit gesteigerter Transportrate, deren Ausprägung durch Chloramphenicol verhindert werden kann.

Über die Aufnahme in die Zelle von Antibiotica, die keine Strukturanalogien zu irgendwelchen Nährstoffen besitzen, ist noch sehr wenig bekannt. Für Tetracyclin (Franklin & Higginson, 1970) und Streptomycin (Bryan & Van den Elzen, 1976) konnte sicher gezeigt werden, daß ihre Aufnahme in die Bakterienzelle Energie-abhängig ist, für Chloramphenicol gibt es nur Hinweise (Vazquez, 1964).

Aufgrund des nicht bekannten Aufnahmemechanismus von Chlor-

amphenicol konnte die Vermutung, daß diese Substanz eine Anreicherung von Disorbimycin in der Zelle verhindert, nicht belegt werden.

Nach den aufgeführten Überlegungen zur Wirkungsweise des Antibioticums läßt sich zwar sagen, daß mit größter Wahrscheinlichkeit durch Disorbimycin primär die RNA-Synthese gehemmt wird, endgültig bewiesen ist es jedoch nicht.

Abschließend sollte noch bemerkt werden, daß es zur Aufklärung der Wirkungsweise des Antibioticums sicher effektiver gewesen wäre, die Versuche anstatt mit Escherichia coli und Bacillus subtilis mit Bacillus brevis durchzuführen.
Es wurde jedoch davon abgesehen, da der Aufwand (auch finanziell) zur Erstellung der Testmethoden mit Bacillus brevis in keinerlei Verhältnis zur antibiotischen Wirksamkeit von Disorbimycin gestanden hätte.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Aus Kulturen des Stammes Penicillium chrysogenum Thom konnte ein lipophiles, gelb gefärbtes Antibioticum - Disorbimycin - isoliert werden.

Die Reinigung von Disorbimycin erfolgte durch Säulenchromatographie an Amberlite XAD-2, einen Extraktionsschritt mit Essigester und Säulenchromatographie an mit KH_2PO_4 vorbehandeltem Kieselgel 60.

Eine endgültige Aufklärung der chemischen Struktur von Disorbimycin steht noch aus. Sorbimycin, ein Abbauprodukt des Antibioticums, konnte chemisch charakterisiert werden. Sorbimycin stellt ein Hexaketid dar, das deutliche strukturelle Ähnlichkeit mit Sorbicillin, einem Pigment aus Penicillium notatum, aufweist.

Disorbimycin zeigt nur auf wenige gram + Bakterien eine Wirkung. Bacillus brevis stellt hierunter den eindeutig empfindlichsten Organismus dar. Gram - Bakterien und Pilze werden durch Disorbimycin in ihrem Wachstum nicht gehemmt.
Für Sorbimycin konnte ebenfalls antibiotische Wirksamkeit gefunden werden. Die Nachweisgrenze auf Bacillus brevis und Bacillus subtilis liegt jedoch um ca. 2 Zehnerpotenzen höher als die von Disorbimycin.

Disorbimycin wird durch in kompletten Nährmedien enthaltene Bestandteile wie Hefeextrakt, Malzextrakt und Pepton antagonisiert und zeigt daher auf chemisch-definiertem Nährboden eine stärkere Hemmwirkung.

In einer Konzentration von 100 µg/ml wirkt Disorbimycin sowohl in der lag- als auch in der log-Phase auf Bacillus subtilis bakteriolytisch und auf Bacillus brevis bakterizid. Darunter liegende Konzentrationen des Antibioticums ergeben bei beiden Organismen eine reversible Hemmung.

Versuche zur Wirkungsweise des Antibioticums ergaben, daß es sich bei Disorbimycin wahrscheinlich um einen Hemmstoff der RNA-Polymerase handelt. Die Hemmung der Proteinsynthese scheint eine Folge der RNA-Synthese-Hemmung zu sein. Eine endgültige Aufklärung der Wirkungsweise von Disorbimycin steht noch aus.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 13, 238-252 (1965).

Bergel, F., A.L. Morrison, A.R. Moss, and H. Rinderknecht: An antibacterial substance from Aspergillus clavatus. J. Chem. Soc. 415-421 (1944).

Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Band 1, 3. Auflage, Verlag Chemie, 175 (1974).

Bonifas, V.: Détermination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfamides. Experimenta 8, 234-235 (1952).

Bryan, L.E., and H.M. Van den Elzen: Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 9, 928-938 (1976).

Cashel, M.: The control of ribonucleic acid synthesis in Escherichia coli. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. J. Biol. Chem. 244, 3133-3141 (1969).

Clutterbuck, P.W., R. Lovell, and H. Raistrick: Studies in the biochemistry of microorganisms XXVI. The formation from glucose by members of the Penicillium chrysogenum series of a pigment, an alkali soluble protein and "penicillin" - the antibacterial substance of Fleming. Biochem. J. 26, 1907-1918 (1932).

Cooper, R.D.G.: New β-Lactam Antibiotics. In: Topics in Antibiotic Chemistry, Vol. 3 (1980).

Corbaz, R., L. Ettlinger, W. Keller-Schierlein und H. Zähner: Zur Systematik der Streptomyceten. 1. Über Streptomyceten mit rhodomycinartigen Pigmenten. Arch. Mikrobiol. 25, 325-332 (1957).

Coultas, M.K., and D.J. Hutchinson: Metabolism of resistent mutants of Streptococcus faecalis. IV. Use of a biophotometer in growth-curve studies. J. Bacteriol. 84, 393-401 (1962).

Cram, D.J., and M. Tishler: Mold Metabolites I. Isolation of several compounds from clinical Penicillin. J. Amer. Chem. Soc. 70, 4238-4239 (1948).

Cram. D.J.: Mold Metabolites II. The structure of Sorbicillin, a pigment produced by the mold Penicillium notatum. J. Amer. Chem. Soc. 70, 4240-4243 (1948).

Davis, B.D., and E.S. Mingioli: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950).

Edlin, G., and P. Broda: Physiology and genetics of the 'ribonucleic acid control' locus in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 32, 206-226 (1968).

Edlin, G., and G.S. Stent: Nucleoside triphosphate pool and the regulation of RNA-synthesis in Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 62, 475-482 (1968).

Eikhom, T.S., J. Jonsen, S. Laland, and T. Refsvik: On the biosynthesis of gramicidin S. Biochem. Biophys. Acta 76, 465-468 (1963).

Franklin, T.J., and B. Higginson: Active accumulation of tetracycline by Escherichia coli. Biochem. J. 116, 287-297 (1970).

Frosch, I.: Ionoferin. Ein neues ionophores Antibiotikum. Dissertation Universität Tübingen (1979).

Fuchs, E., R.L. Millette, W. Zillig, and G. Walter: Influence of salts on RNA synthesis by DNA-dependent-RNA-polymerase from Escherichia coli. European J. Biochem. 3, 183-193 (1967).

Gale, E.F., E. Cundliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond, and M.J. Waring: The molecular basis of antibiotic action. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley & Sons (1972).

Grell, K.J.: Entwicklung und Geschlechtsbestimmung von Eucoccidium dinophili. Archiv für Parasitenkunde 99, 156-186 (1954).

Halder, A., and S.K. Bose: Reversal of mycobacillin inhibition reactions by sterols and phospholipids. J. Antibiotics 24, 779-784 (1971).

Hanka, L.J.: In vitro screen for antimetabolites. Int. Congr. Chemother. Proc. 5th 3, 351-358 (1967).

Hartmann, G., K.O. Honikel, F. Knüsel, and J. Nüesch: The specific inhibition of the DNA directed RNA synthesis by rifamycin. Biochim. Biophys. Acta 145, 843-844 (1967).

Hassal, C.H., and A.R. Todd: The structure of Clavatol, a metabolic product of Aspergillus clavatus. J. Chem. Soc. 611-613 (1947).

Heller, K., C. Schulz, R. Löser, and R. Röschenthaler: The inhibition of bacterial growth by Ochratoxin A. Canad. J. Microbiol. 21, 7 (1975).

Heller, K.: Persönliche Mitteilung (1980)

Henderson, P.J.F., J.D. McGivan, and J.B. Chappell: The action of certain antibiotics on mitochondrial, erythrocyte and artificial phosphilipid membrans. The role of induced proton permeability. Biochem. J. 111, 521-535 (1969).

Höhne, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974).

Höltje, J.V.: Die Aufnahme von Antibiotica in die Bakterienzelle. Forum Mikrobiologie 5, 249-255 (1979)

Hütter, R., W. Keller-Schierlein, J. Nüesch und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung: Scopamycine. Arch. Microbiol. 51, 1-8 (1965).

Juillard, M.: Über Cobalamine einer Mutante von Bacillus megaterium De Bary. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 110, 701-727 (1957).

Kelmers, A.D.: Preparation of a highly purified Phenylalanin transfer ribonucleic acid. J. of Biol. Chemistry 241, No. 15, 3540-3545 (1966).

Kersten, H., and W. Kersten: Inhibitors of Nucleic acid synthesis. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1974).

Kirk, J.M.: The mode of action of actinomycin D. Biochim. Biophys. Acta 42, 167-169 (1960).

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971).

Knippers, R.: Molekulare Genetik. Stuttgart: Thieme (1971).

Komischke, K.: Monoclonale Antikörper gegen das multifunktionale ton A - Rezeptorprotein an den äußeren Membranen von Escherichia coli. Diplomarbeit Universität Tübingen (1980).

Korzybski, T., Z. Kowszyk-Gindifer, and W. Kurylowicz: Antibiotics Vol. II, Pergamon Press, Oxford (1967).

Koschel, K., G. Hartmann, W. Kersten und H. Kersten: Die Wirkung des Chromomycins und einiger Anthracyclinantibiotica auf die DNS-abhängige Nucleinsäuresynthese. Biochem. 7 344, 76-86 (1966).

Kuhn, R.: Biological significance of boric acid. Chem. Ztg. Wien 46, 1-9 (1943).

Kurz, G. und K. Wallenfels in: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) Bd. 2, 1225-1229 und 1324-1327, Verlag Chemie, Weinheim (1974).

Lund, E., and N.O. Kjeldgaard: Metabolism of guanosine tetraphosphate in Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 28, 316-326 (1972).

Matthaei, H., G. Heller, H.P. Voigt, R. Neth, G. Schöch, and H. Kübler: Analysis of a genetic code by amino acid adapting. In: D. Shugar: Genetic elements. Academic Press, New York-London (1972).

McOmie, J.F.W., and M.S. Tute: A new synthesis of Clavatol and of Sorbicillin. J. Chem. Soc. 3226-3227 (1958).

Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1973).

Nirenberg, M.W., and J.H. Matthaei: The dependence of cell-free protein synthesis in E.coli upon naturally occuring or synthetic polyribonucleotides. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1588-1602 (1961).

Old, J.M., and D.S. Jones: The aminoacylation of transfer ribonucleic acid. Inhibitory effects of some amino acid analogues with altered side chains. Biochem. J. 159, 503-511 (1976 a).

Old, J.M., and D.S. Jones: Activation of leucyl-t-RNA formation in preparations from rat liver. FEBS Lett. 64, 148-151 (1976 b).

Old, J.M., and D.S. Jones: The aminoacylation of transfer ribonucleic acid. Recognition of methionine by Escherichia coli methionyl ribonucleic acid synthetase. Biochem. J. 165, 367-373 (1977).

Osborn, M.J., J.E. Gander, E. Parisi, and J. Carson: Mechanism of assembly to the outer membrane of Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 247, 3962-3972 (1972).

Oxford, A.E., H. Raistrick, and P. Simonart: 29. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 60. Griseofulvin, $C_{17}H_{17}O_6Cl$, a metabolic product of Penicillium Dierckx. Biochem. J. 33, 240 (1939).

Pache, W. und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 76. Mitteilung: Bindung von Antibiotica an Lipoprotein. Arch. Mikrobiol. 66, 281-288 (1969).

Pongs, O.: Chloramphenicol. In: Antibiotics V/I. Mechanism of action of antibacterial agents. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1979).

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotica. Dissertation Universität Tübingen (1967).

Pridham, T.G., P. Anderson, C. Foley, L.A. Lindenfelser, C.W. Hesseltine, and R.G. Benedict: A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomyces. Antibiot. Ann. 947-953 (1956/1957).

Raistrick, H., and P. Rudman: Studies in the biochemistry of micro-organisms. 97. Flapipin, a crystalline metabolite of Aspergillus flavipes (Bainier and Sartory) Thom and Church and Aspergillus terreus Thom. Biochem. J. 63, 395-405 (1956).

Raper, K.B., and Ch. Thom: A manual of the Penicillia. Hafner Publishing Company: New York and London (1968).

Ryan, A.M., and E. Borek: The relaxed control phenomen. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 11, 193-228 (1971).

Santo, L.: Suche nach Antibiotika mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien, Tiradamycin A und B. Dissertation Universität Tübingen (1976).

Sheehan, J.C.: In: Penicillin fifty years after Fleming. (Baddiley, J. and E.P. Abraham, Hrsg.) London, The Royal Society (1980).

Siddhikol, C., J.W. Erbstoeszer, and B. Weisblum: Mode of action of streptolydigin. J. Bacteriol. 99, 151-155 (1969).

Singer, U.: Einige biologische Wirkungen von Ochratoxin A bei Escherichia coli. Diplomarbeit Universität Münster (1973).

Söll, D., and P.R. Schimmel: Aminoacyl-t-RNA synthetases. In: The Enzymes, Vol. X. (P.D. Boyer, ed.) New York, London: Academic Press (1974).

Staehelin, T., and D.R. Maglott: Preparation of Escherichia coli subunits active in polypeptide synthesis. In: Methods in Enzymology, Vol. XX, part C. (K. Moldave and L. Grossman, ed.) New York, London: Academic Press (1971).

Stahl: Dünnschichtchromatographie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag (1967).

Stent, G.S., and S. Brenner: A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 2005-2014 (1961).

Swanbeck, G.: Interaction between desoxyribonucleic acid and some anthracene and anthraquinone derivates. Biochim. Biophys. Acta 123, 630-633 (1966).

Swanton, M., and G. Edlin: Isolation and characterisation of an RNA relaxed mutant of B. subtilis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 583-588 (1972).

Tejmar-Kolar, L.: Persönliche Mitteilung (1980).

Traub, P., S. Mizushima, C.V. Lowry, and M. Nomura: Reconstitution of ribosomes from subribosomal components. In: Methods in Enzymology, Vol. XX, part C. (K. Moldave and L. Grossmann, eds.) New York, London: Academic Press (1971).

Turner, W.B.: Fungal Metabolites. Academic Press London and New York (1971).

Ueno, Y., J. Ueno, and K. Mizumoto: The mode of binding of Luteoskyrin, a hepatotoxic pigment of Penicillium islandicum Sopp, to desoxyribonucleic acid. Japan. J. Exp. Med. 38, 47-64 (1968).

Vazquez, D.: Uptake and binding of Chloramphenicol by sensitive and resistant organisms. Nature (London) 203, 257-258 (1964).

Watson, J.D.: Molecular biology of the gene. 3rd edition. W.A. Benjamin Inc. Menlo Park, 389-397 (1976).

Wehrle, H.: Persönliche Mitteilung (1980).

Wehrli, W., and M. Staehlin: Rifamycins and other ansamycins. In: Antibiotics III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents, pp. 252-268.(J.W. Corcoran and F.E. Hahn, Ed.) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1975).

Wolf, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30 S - Untereinheit. Dissertation Universität Tübingen (1971).

Wolf, H., H. Zähner, and K. Nierhaus: Kirromycin, an inhibitor of 30 S ribosomal subunits function. FEBS Lett. 21, 347-350 (1972).

Zähner, H., R. Hütter und E. Bachmann: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 23. Mitteilung: Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Microbiol. 36, 325-349 (1960).

Zähner, H., and W.K. Maas: Biology of antibiotics. Springer Verlag New York-Heidelberg-Berlin (1972).

Lebenslauf

8.1.1953	geboren in Stuttgart
1959-1963	Grundschule in Rottweil
1963-1971	Droste-Hülshoff-Gymnasium in Rottweil
2.7.1971	Reifeprüfung am Droste-Hülshoff-Gymnasium in Rottweil
1971-1973	Praktikum in der Hubertus-Apotheke in Stuttgart
21.9.1973	Pharmazeutische Vorprüfung in Stuttgart
ab WS 1974/75	Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen
9.9.1976	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung an der Universität Tübingen
16.3.1978	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung an der Universität Tübingen
5.5.1978	Approbation als Apotheker
seit Juni 1978	Anfertigung der Dissertation "Disorbimycin, ein neues Engspektrum-Antibioticum aus Penicillium chrysogenum" am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner.

Meine akademischen Lehrer waren:

H.P.T. Ammon, H. Auterhoff, R.-E. Bader, E. Graf, K.-A. Kovar, W. Nakel, E. Reinhard, J. Schultz, H. Zähner.